

# Influence of L-arginine oral supplementation on oxidative stress in patients with intermittent claudication

## Wpływ doustnej suplementacji L-argininy na stres osydacyjny u chorych z chromaniem przestankowym

Maciej Micker<sup>1</sup>, Paweł Chęciński<sup>1</sup>, Anna Jabłecka<sup>2</sup>, Hanna Krauss<sup>3</sup>, Stanisław Zapalski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of General and Vascular Surgery, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences in Poznań, Poland; <sup>2</sup>Department of Clinical Pharmacology, Institute of Cardiology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences in Poznań, Poland; <sup>3</sup>Department of Physiology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences in Poznań, Poland (<sup>1</sup>II Katedra Chirurgii, Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń AM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; <sup>2</sup>Zakład Farmakologii Klinicznej, Instytut Kardiologii AM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; <sup>3</sup>Katedra i Zakład Fizjologii AM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu)

### Abstract

**Background.** It is suggested that the administration of L-arginine to patients with NO deficiency is the rational method both of increasing NO production by the endothelium and decreasing the free radical release. In the last year it was proved that this therapeutic procedure could be successful in patients with atherosclerotic ischaemia of the lower extremities.

**Aim of the study.** The aim of this study was the estimation of the influence of 28-day L-arginine oral supplementation on NO concentration and the parameters of total antioxidant status (TAS) in patients with intermittent claudication.

**Material and methods.** 16 patients (8 female and 8 male) were examined diagnosed with atherosclerosis of the lower extremities in Fontaine's II stage and receiving L-arginine in the dose of 3 × 4 g/day. During the study patients were under accurate clinical observation whose aim was to evaluate drug tolerance and to notice possible adverse effects of L-arginine used in therapy. During the study in 0, after 3 h, and on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, and 28<sup>th</sup> day, subjective and objective examinations were conducted with evaluation of the intermittent claudication distance. From every patient the blood samples were taken for the determination of NO concentration and TAS.

**Results.** After L-arginine treatment in all patients we observed clinical improvement, such as elongation of intermittent claudication distance. We noticed the increase of NO-concentration and higher TAS after 3 h, 7, 14 and 28 days of L-arginine treatment.

**Conclusions.** Oral supplementation of L-arginine causes a significant increase of NO-concentration and TAS in patients with intermittent claudication.

**Key words:** L-arginine, endothelium, intermittent claudication, nitric oxide, total antioxidant status

### Streszczenie

**Wstęp.** Sugeruje się, że podanie L-argininy osobom z niedoborem NO jest racjonalną metodą zarówno zwiększania wytwarzania NO przez śródbłonek, jak i zmniejszenia uwalniania wolnych rodników. W ostatnich latach wykazano, że takie postępowanie lecznicze może być skuteczne u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Lek. med. Maciej Micker, II Katedra Chirurgii Ogólnej i Naczyń AM, ul. Długa 1/2, 61–848 Poznań, Poland  
tel: +48 (0 61) 854 90 82, e-mail: niunnio@wp.pl

**Cel pracy.** Celem pracy była ocena wpływu 28-dniowej doustnej suplementacji L-argininy na stężenie NO oraz parametry całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza u chorych z chromaniem przestankowym.

**Material i metody.** Badano 16 chorych w wieku 42–74 lat leczonych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń AM w Poznaniu z rozpoznaną miażdżycą tętnic kończyn dolnych w II stopniu wg klasyfikacji Fontaine'a, którzy otrzymywali L-argininę w dawce  $3 \times 4$  g/d.

Chorych poddano miesięcznej obserwacji klinicznej w celu określenia tolerancji terapii i wychwycenia ewentualnych działań niepożądanych. W trakcie badania, tzn. w 0, 7, 14 i 28 dniu u każdego chorego przeprowadzono pełne badania podmiotowe i przedmiotowe z określeniem dystansu chromania przestankowego i wartości wskaźnika kostka-ramię, a także pobierano krew w celu oznaczenia stężenia tlenu azotu oraz całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza.

**Wyniki.** Po podaniu L-argininy u wszystkich chorych nastąpiła poprawa kliniczna w postaci wydłużenia dystansu przejścia bezbólowego. Zaobserwowano wzrost stężenia NO i całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza po 3 h, 7, 14 i 28 dniach podawania L-argininy.

**Wnioski.** Doustna suplementacja L-argininy powoduje istotne zwiększenie stężenia NO oraz TAS u chorych z chromaniem przestankowym.

**Słowa kluczowe:** L-arginina, śródbłonek, chromanie przestankowe, tlenek azotu, całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza

## Introduction

More and more data indicate that the increase of production of free radicals by the endothelium with simultaneously decreasing synthesis and/or increasing nitric oxide (NO) degradation is the basis of the changes in vessel structure and reactivity [1–3]. This phenomenon is observed in many diseases [4–6]. It was observed that cofactors deficiency (particularly BH4-tetrahydrobiopterine) and the L-arginine, NO-synthase, not undergoing dimerysation, generates peroxide ions. L-arginine supplementation decreases the peroxide ion generation and increases NO synthesis [6]. This suggests that the administration of L-arginine to patients with NO deficiency is the rational method both of increasing NO production by the endothelium and decreasing free radical release [2, 4, 7]. In the last year it was proved that this therapeutic procedure can be successful in patients with atheromatous ischaemia of the lower extremities [8].

## Aim of the study

The aim of this study was the estimation of the influence of 28-day L-arginine oral supplementation on NO concentration and the parameters of total antioxidant status (TAS) in patients with atherosclerosis of the lower extremities Fontaine's II stage.

This trial was conducted with the object of obtaining answers to two questions: 1. Does oral L-arginine supplementation cause a significant increase of the NO level? 2. How does that supplementation influence the serum total antioxidant status in examined patients?

## Wstęp

Coraz więcej danych wskazuje, że zwiększone wytwarzanie wolnych rodników przez śródbłonek, z równoczesnym zmniejszeniem syntezy i/lub zwiększoną degradacją tlenu azotu (NO, *nitric oxide*), leży u podstawy zmian w strukturze i reaktywności naczyń [1–3]. Zjawisko to obserwuje się w wielu procesach chorobowych [4–6]. Zaobserwowano, że w warunkach niedoboru zarówno kofaktorów (zwłaszcza BH4-tetrahydrobiopteryny), jak i samej L-argininy, syntaza NO nie ulegając dimeryzacji, zmniejsza generację jonów ponadtlenkowych [6]. Zatem podanie L-argininy osobom z niedoborem NO może być racjonalną metodą zwiększania wytwarzania NO przez śródbłonek oraz zmniejszania uwalnianie wolnych rodników [2, 4, 7]. W ostatnich latach wykazano, że takie postępowanie lecznicze może być skuteczne u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych [8].

## Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu 28-dniowej doustnej suplementacji L-argininy na stężenie NO oraz parametrów całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza (TAS, *total antioxidant status*) u chorych z chromaniem przestankowym.

Próbę przeprowadzono w celu udzielenia odpowiedzi na dwa pytania: 1. Czy doustna suplementacja L-argininy istotnie zwiększa stężenie NO? 2. Jaki jest wpływ tej suplementacji na całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza u tych chorych?

## Material and methods

To evaluate the influence of 28-day L-arginine oral supplementation on NO level and serum parameters of total antioxidant status, 16 patients (8 female and 8 male), aged from 42 to 74 years (mean 58.3 years), were examined with atherosclerosis of the lower extremities diagnosis in Fontaine's II stage. The patients received L-arginine in the dose of  $3 \times 4$  g/day.

During the study in 0, after 3 h, and on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, and 28<sup>th</sup> day, subjective and objective examinations were conducted with evaluation of the intermittent claudication distance and the value of ankle-brachial index. From every patient blood samples were taken for the determination of NO concentration and TAS. The study excluded patients with: thyroid function disturbances, alcohol abuse, with advanced hepatocellular damage (transaminase level twice as high as normal value), with severe renal failure (serum creatine level  $> 400$  mg/mL), patients with electrolytic disturbances and patients in whom coexisting diseases required the administration of drugs, which could influence the values of estimated parameters.

During the study the patients were under accurate clinical observation whose aim was to evaluate drug tolerance and to notice possible adverse effects of L-arginine used in therapy. The concentration of nitric oxide (NO) and total antioxidant status (TAS) were determined by the use of spectrophotometer methods.

## Results

The characteristics of the study group are presented in Table I. After L-arginine treatment in all patients we observed clinical improvement, such as elongation of intermittent claudication distance (Fig. 1). In patients

**Table I.** The characteristic of the group

**Tabela I.** Charakterystyka grupy badanych chorych

	Mean Średnia	Minimum	Maximum	SD
Na [mmol/l]	140.25	137.77	144.00	1.91
K [mmol/l]	4.31	3.10	5.04	0.53
Hb [g/dl]	13.64	7.94	16.60	1.98
Tg [mmol/l]	2.01	0.84	7.32	1.49
Ch C [mmol/l]	6.83	4.94	9.68	1.17
Cholesterol całkowity				
HDL Ch [mmol/l]	1.44	0.9	2.08	0.34
Cholesterol frakcji HDL				
LDL Ch [mmol/l]	3.59	2.9	4.32	0.45
Cholesterol frakcji LDL				

SD (standard deviation) — odchylenie standardowe

## Materiał i metody

Prezentowana praca jest fragmentem obszernego badania, w którym oceniono wpływ doustnej suplementacji L-argininy na stężenie NO i wskaźniki wydolności naczyniowej u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych.

W celu oceny wpływu 28-dniowej, doustnej suplementacji L-argininy na stężenie NO oraz parametry TAS analizowano łącznie 16 przypadków hospitalizowanych chorych (8 kobiet i 8 mężczyzn) z rozpoznaną miażdżycą tętnic kończyn dolnych II stopnia wg klasyfikacji Fontaine'a, w wieku 42–74 lat (średnio 58,3 lat), którym 3 razy dziennie podawano L-argininę w dawce 4 g/d. W czasie badania, tzn. w 0 dniu, po 3 h, 7, 14 i 28 dniu, u każdego pacjenta przeprowadzono pełne badanie podmiotowe i przedmiotowe z określeniem dystansu chromania przestankowego i wartości wskaźnika kostka-ramię, a także pobrano krew w celu oznaczenia stężenia NO oraz TAS. Z badania wykluczono chorych: na cukrzycę, z zaburzeniami funkcji tarczycy, nadużywających alkoholu, z zaawansowanym uszkodzeniem wątroby (stężenie transaminaz przekraczających 2-krotnie normę), z ciężką niewydolnością nerek (stężenie kreatyny w osoczu  $> 400$  mg/ml) oraz pacjentów z zaburzeniami gospodarki elektrolitowej. Z badania wykluczono także osoby, które ze względu na współistniejące schorzenia przyjmowały leki mogące wpływać na oceniane w badaniu parametry.

W czasie badania, chorzy podlegali ścisłej obserwacji klinicznej w celu określenia tolerancji L-argininy, a także wychwycenia ewentualnych działań niepożądanych stosowanej terapii. Dystans przejścia bezbólowego mierzono na poziomej bieżni Cambridge 9800 o przesuwie taśmy 3,5 km/h.

Stężenie tlenu azotu oraz całkowity potencjał antyoksydacyjny określono metodami spektrofotometrycznymi. Do testowania różnic pomiędzy średnimi stosowano testy t dla prób zależnych, testy t dla prób niezależnych oraz test jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA, *analysis of variance*).

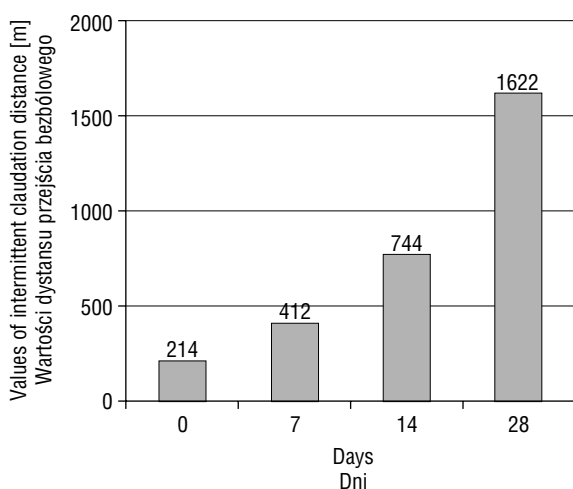
## Wyniki

Charakterystykę badanej grupy przedstawiono w tabeli I. Nie wykazano różnic statystycznie istotnych w kolejnych pomiarach wskaźnika kostka-ramię. Po podaniu L-argininy u wszystkich chorych nastąpiła poprawa kliniczna w postaci wydłużenia dystansu przejścia bezbólowego (ryc. 1). Dystans przejścia bezbólowego wyjściowo wynosił  $214,29 \pm 96,76$  m. Po 7 dniach podawania L-argininy w dawce 3 razy 4 g wydłużył się do  $412,86 \pm 223,96$  m ( $p < 0,018$ ). Po 14 dniach wydłużenie dystansu wynosiło  $744,29 \pm 439,01$  m ( $p < 0,012$ ), a po 28 dniach —  $1622,86 \pm 899,36$  m ( $p < 0,0042$ ).

initial intermittent claudication distance was  $214.29 \pm \pm 96.76$  m. After 7 days of L-arginine supplementation in the dose of 4 g three times per day the distance lengthened to  $412.86 \pm 223.96$  m ( $P < 0.018$ ). After 14 days the distance was  $744.29 \pm 439.01$  m ( $P < 0.012$ ), and after 28 days it was  $1622.86 \pm 899.36$  m ( $P < 0.0042$ ). We noticed (Fig. 2) a statistically insignificant increase of NO-concentration after 3 h, 7 and 14 days of L-arginine treatment and a statistically significant increase of NO-concentration after 28 days of oral administration of this amino acid ( $P < 0.01$ ). The Total Antioxidant Status (TAS) in serum after 3 h ( $P < 0.01$ ), 7 ( $P < 0.01$ ), 14 ( $P < 0.01$ ) and 28 days ( $P < 0.01$ ) of the L-arginine therapy was significantly higher in comparison with results before its beginning (Fig. 3).

## Discussion

At the beginning of the 1990s it was proved that the supplementation of L-arginine to patients with hypercholesterolaemia intensifies the reactivity dilatation of forearm vessels by endothelic nitric oxide [4]. It was also proved that intravenous administration of L-arginine intensifies the vasodilatation effect of the endothelium to arteriosclerosis coronary vessels [7]. After that time, it was confirmed that both single intravenous administration and continuous oral supplementation of L-arginine improve vessel activity in patients with hypercholesterolaemia, with stable angina pectoris and with arteriosclerosis obliterans [5, 8]. In patients with arteriosclerosis obliterans of the lower extremities clinical improvement was observed, such as elongation of intermittent claudication distance, microcirculation

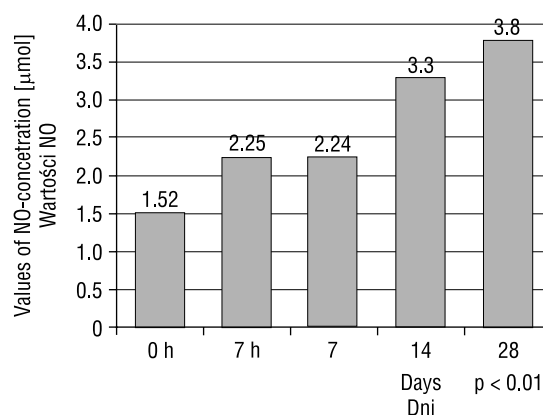


**Figure 1.** Values of intermittent claudication distance in the group  
**Rycina 1.** Wartości dystansu przejścia bezbólowego w grupie badanych chorych

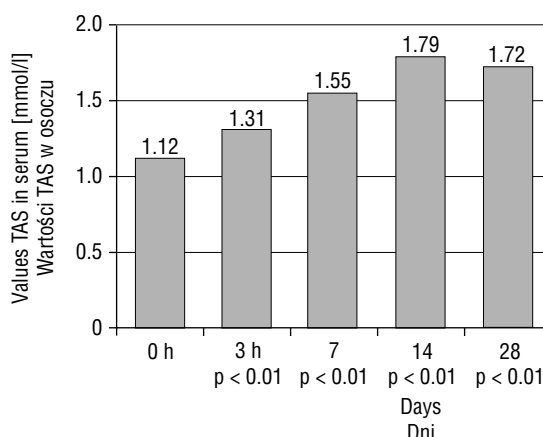
Zaobserwowano nieistotny statystycznie wzrost stężenia NO po 3 h, 7 i 14 dniach leczenia L-argininą oraz znamienne wyższy wzrost stężenia NO po 28 dniach doustnego stosowania tego aminokwasu ( $p < 0,01$ ) (ryc. 2). Odnotowano także znamienne wyższy całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza po 3 h ( $p < 0,01$ ), 7 dniach ( $p < 0,01$ ), 14 dniach ( $p < 0,01$ ) i 28 dniach ( $p < 0,01$ ) trwania terapii w porównaniu z wynikami przed jej rozpoczęciem (ryc. 3).

## Dyskusja

Na początku lat 90. wykazano, że podanie L-argininy osobom z hipercholesterolemią nasila reaktywne rozszerzenie naczyń przedramienia za pośrednictwem śródbłonkowego NO [4]. Udowodniono również, że dożylnie podawanie L-argininy zwiększa działanie naczyniorozszerzające śródbłonka w zmienionych miażdżycowo tętnicach wieńcowych [7]. Od tego czasu w wielu badaniach po-



**Figure 2.** The values of NO-concentration  
**Rycina 2.** Wartości stężenia tlenu azotu (NO) u chorych z chroaniem przestankowym



**Figure 3.** The values of TAS concentration in serum  
**Rycina 3.** Wartości TAS w grupie badanych chorych TAS (total antioxidant status) — całkowity potencjał antyoksydacyjny

improvement, inhibition of thrombosis and stimulation of fibrinolytic activity [7]. The aim of this study was to estimate the influence of 28-day L-arginine oral supplementation in the dose of  $3 \times 4$  g/day on oxidative stress in patients with arteriosclerosis of the lower extremities Fontaine's IInd stage. After L-arginine oral supplementation in all patients clinical improvement was observed, such as elongation of the intermittent claudication distance, probably due to the increase of NO and TAS concentration in the blood. Until now the accurate mechanism of L-arginine improvement of the endothelium is unknown. We think that L-arginine both gives the substrate to the eNOS, increasing NO synthesis, and decreases the release of peroxides from the endothelium due to indirect antioxidant activity [7].

### Conclusions

1. Oral supplementation of L-arginine in the dose of  $3 \times 4$  g/day causes a significant increase of NO-concentration and TAS in patients with atherosclerosis of the lower extremities in Fontaine's II stage.
2. TAS increase can result from the indirect antioxidation of L-arginine action expressed by a decreasing intensification of radical reactions and/or antioxidative enzyme induction.

This paper was presented at the X Polish-German Meeting of Vascular Surgeons in Karpacz between 7 and 9 June 2002.

### References

1. Boger RH, Bode-Boger SM, Mugge A, et al. (1995) Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-Arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis*, 117: 273–284.
2. Bogdański P, Pupek-Musialik D, Jabłeczka A, et al. (2001) Suplementacja L-argininy w nadciśnieniu tętniczym — fakty i kontrowersje. *Nadciśnienie Tętnicze*, 5 (2): 133–139.
3. Mombouli JV (1997) ACE inhibition, endothelial function and coronary artery lesions: role of kinins and nitric oxide. *Drugs*, 54 (Suppl 5): 12–22.
4. Creager MA, Gallagher SM, Girerd XJ, et al. (1992) L-Arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*, 90: 1248–1253.
5. Ceremużyński L, Chamiec T, Herbaczyńska-Cedro K (1997) Effect of supplemental oral L-arginine on exercise capacity in patients with stable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 80: 331–333.
6. Loscalzo J (2000) What We Know and Don't Know About L-Arginine and NO. *Circulation*, 101: 2126–2129.
7. Dubois-Rande JL, Zelinsky R, Roudot F, et al. (1992) Effects of infusion of L-arginine into the left anterior descending coronary artery on acetylcholine-induced vasoconstriction of human atheromatous coronary arteries. *Am J Cardiol*, 70: 1269–1275.
8. Grodzińska L, Kostka-Trąbka E, Sławiński M, et al. (1993) Próba zastosowania L-argininy u pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych. *Probl Terapii Monit*, 4 (4): 201–202.

twierdzono, że jednorazowe podanie L-argininy oraz jej długotrwałe stosowanie doustne poprawia czynność naczyń u chorych z hipercholesterolemią, ze stabilną dławicą piersiową oraz z miażdżycą tętnic kończyn dolnych [5, 8]. U osób z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych obserwowano zadowalającą skuteczność dożylnego i doustnego leczenia L-argininą w postaci ustąpienia lub złagodzenia objawów podmiotowych w niedokrwionych kończynach dolnych, wydłużenia dystansu przejścia bezbólowego, poprawy mikrokrążenia, hamowania agregacji płytek krwi oraz wzrostu aktywności układu fibrynolitycznego [7]. W prezentowanym badaniu podjęto próbę określenia wpływu 28-dniowej suplementacji dawki podawanej 4 g L-argininy podawanej 3 razy dziennie na stres oksydacyjny u chorych z rozpoznaną miażdżycą tętnic kończyn dolnych II stopnia wg klasyfikacji Fontaine'a. Stwierdzono, że przy doustnym podaniu L-argininy wydłuża się dystans przejścia bezbólowego, co wynika prawdopodobnie ze zwiększenia stężenia NO i TAS we krwi badanych chorych. Jak dotąd dokładny mechanizm poprawy czynności śródbłonna przez L-argininę pozostaje nieznan. Dlatego bierze się pod uwagę wiele mechanizmów bezpośrednich i pośrednich wyjaśniających korzystne skutki działania tego aminokwasu. Sądzi się, że L-arginina działa korzystnie nie tylko poprzez dostarczenie substratu dla eNOS i zwiększenia w ten sposób syntezy NO, lecz także poprzez pośrednie działanie antyoksydacyjne, wyrażające się zmniejszeniem uwalniania anionu nadtlenkowego ze śródbłonna [7].

### Wnioski

1. Doustna suplementacja L-argininy w dawce 3 razy 4 g/d. istotnie zwiększa stężenie NO oraz TAS u chorych z miażdżycą tętnic kończyn dolnych w II stadium wg klasyfikacji Fontaine'a.
2. Wzrost TAS może wynikać z pośredniego działania antyoksydacyjnego L-argininy wyrażającego się zmniejszeniem nasilenia reakcji wolnorodnikowych i/lub indukcji enzymów antyoksydacyjnych.

Praca została wygłoszona podczas X Spotkania Polsko-Niemieckiego Towarzystwa Chirurgów Naczyniowych w Karpaczu w dniach 7–9.06.2002 r.

tion of human atheromatous coronary arteries. *Am J Cardiol*, 70: 1269–1275.

8. Grodzińska L, Kostka-Trąbka E, Sławiński M, et al. (1993) Próba zastosowania L-argininy u pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych. *Probl Terapii Monit*, 4 (4): 201–202.