

В. Ф. Сагач, О. В. Базілюк, А. В. Коцюруба, О. М. Буханевіч

Порушення ендотелійзалежних судинних реакцій, аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії

У нормотензивних крыс (I группа) и спонтанно гипертензивных крыс (II группа) – с низким (1-я подгруппа) и высоким (2-я подгруппа) уровнем системного артериального давления (САД) в различных тканях исследовали активность аргиназы и синтазы оксида азота (NOS), а также содержание их продуктов – мочевины и нитрит-аниона (NO_2^-). На изолированных препаратах грудной аорты регистрировались эндотелийзависимые дилататорные реакции гладких мышц на ацетилхолин. Установлено, что в сердце, аорте, плазме и эритроцитах гипертензивных крыс 2-й подгруппы резко увеличивается активность аргиназы и содержание мочевины. В сердце активность аргиназы достигает $27,96 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка} \pm 5,92 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка}$, в аорте – $4,74 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка} \pm 0,99 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка}$ (у крыс I группы $1,32 \pm 0,12$ и $1,12 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка} \pm 0,07 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка}$ соответственно). Содержание мочевины в сердце составляет $679,5 \text{ нмоль/мг белка} \pm 121,19 \text{ нмоль/мг белка}$, в аорте $350,6 \text{ нмоль/мг белка} \pm 63,6 \text{ нмоль/мг белка}$ (у нормотензивных крыс $36,8 \pm 5,3$, $43,02 \text{ нмоль/мг белка} \pm 9,55 \text{ нмоль/мг белка}$ соответственно). Это сопровождалось уменьшением активности NOS и неоднозначными изменениями содержания NO_2^- в исследуемых тканях. Так, активность NOS в сердце и аорте уменьшалась до $0,018 \pm 0,005$ и $0,183 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка} \pm 0,037 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка}$, соответственно, в сравнении с $0,093 \pm 0,014$ и $0,41 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка} \pm 0,07 \text{ нмоль/мин} \cdot \text{мг белка}$ у крыс I группы. Содержание NO_2^- в аорте снижалось до $0,79 \text{ нмоль/мг белка} \pm 0,06 \text{ нмоль/мг белка}$ (в норме $2,15 \text{ нмоль/мг белка} \pm 0,18 \text{ нмоль/мг белка}$), а в сердце, наоборот, – увеличивалось до $0,63 \text{ нмоль/мг белка} \pm 0,13 \text{ нмоль/мг белка}$ (в норме $0,264 \text{ нмоль/мг белка} \pm 0,04 \text{ нмоль/мг белка}$). У крыс 2-й подгруппы угнетались эндотелийзависимые дилататорные реакции гладких мышц грудной аорты на ацетилхолин (10^{-6} моль/л). Почти вдвое снижалась их амплитуда и в 4 раза увеличивался латентный период развития реакции. Все выявленные изменения биохимических показателей в сердце, аорте, плазме и эритроцитах, а также сократительной активности аорты, оказались характерными и для крыс 1-й подгруппы, но количественно они были менее выражены. Таким образом, впервые на модели артериальной гипертензии нами исследована активность двух альтернативных путей метаболизма L-аргинина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при артериальной гипертензии активируется неокислительный (аргиназный) и ингибируется окислительный (NO-синтазный) путь метаболизма L-аргинина. Изменение баланса между ними сопровождается резким угнетением эндотелийзависимых вазодилататорных реакций. Все это дает нам основание полагать, что первопричиной повышения артериального давления являются генетически и количественно детерминированные повреждения биохимического гомеостаза, а также зависимой от него эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса.

© В. Ф. Сагач, О. В. Базілюк, А. В. Коцюруба, О. М. Буханевіч

Вступ

За сучасними даними ендотелій судин є джерелом багатьох біологічно активних речовин різної природи та характеру дії. Участь його в регуляції тонуусу судин і гомеостазі визначається високою секреторною здатністю, яка стимулюється і модулюється різними фармакологічними та фізіологічними чинниками. Найбільше відомою вазоактивною речовиною, що синтезуються в ендотелії, виключаючи простагліцин, є ендотеліальний фактор розслаблення, ідентифікований як оксид азоту [23]. Він синтезується ендотеліоцитами *de novo* з амінокислоти L-аргініну за участю Ca^{2+} -га кальмодулінзалежного ферменту — ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) [16]. Зараз уже добре відомо, що оксид азоту (NO) відіграє важливу роль у регуляції серцево-судинної, нервової, ендокринної систем, бере участь в тканинному диханні, взаємодії нейтрофілів і макрофагів, експресії генів, ремоделюванні судинної стінки тощо. Тому його дефіцит або надлишок уможлиблює розвиток багатьох патологічних змін і захворювань.

Раніше вважали, що єдиним ферментом, який розщепляє L-аргінін, є аргіназа. Її присутність виявлено в багатьох тканинах, в тому числі в ендотеліоцитах, гладеньком'язових клітинах (ГМК) судин, еритроцитах, різних типах клітин головного мозку, печінки, нирок тощо. Функції аргінази до останнього часу пов'язували виключно з деградацією аргініну для видалення надлишкового білкового азоту у вигляді сечовини (карбаміду). Встановлено, що сечовина може регулювати активність багатьох ферментів [26], транспорт іонів через деякі канали [19] і, навіть, експресію певних генів [34]. Сечовина є інгібітором індукцибельної синтази (iNOS) [25], ефективним «скавенжером» іонів заліза (Fe^{2+}) [5], що зумовлює її високу антиоксидантну активність [3]. Крім того, за нашими даними, сечовина в великих концентраціях має також вазоконстрикторні властивості [2].

З відкриттям NO-синтазної реакції стало очевидним, що метаболізм L-аргініну здійснюється, як мінімум, двома альтернативними шляхами: по окисному (NO-синтазному) шляху з утворенням L-цитруліну та NO і по неокисному (аргіназному) шляху з утворенням L-орнітину та сечовини. Звідси виникає можливість реципрокної або синхронної модуляції цих двох шляхів.

Відомо, що при артеріальній гіпертензії в ендотелії судин, крім структурних, розвиваються і функціональні ушкодження. Численними дослідженнями, в тому числі і нашими, встановлено, що за цих умов порушуються залежні від ендотелію вазодилаторні реакції. Це пов'язують з пригніченням синтезу NO. В той же час, сам механізм розслаблення ГМ певно не ушкоджується, оскільки реакції на незалежні від ендотелію агоністи відтворюються майже без змін [21, 22, 29, 31–33]. Встановлено також, що скорочувальні білки ГМК судин спонтанно гіпертензивних щурів мають більш високу, порівняно з такими нормотензивних щурів, чутливість до Ca^{2+} і в основі цього явища лежить підвищена активність С-кінази ГМК [24, 30]. В ендотелії таких щурів виявлено більш високий вміст ендотеліну. Свій потужний вазоконстрикторний вплив він реалізує не тільки завдяки надходженню поза-та внутрішньоклітинного Ca^{2+} , але і завдяки збільшенню чутливості скорочувальних білків ГМК судин до Ca^{2+} [24]. Внаслідок цього

потенціюються вазоконстрикторні впливи [1, 31], що з одночасним зниженням синтезу NO, уможливорює підвищення тонуусу судин. Проте дотепер залишається без відповіді питання, що має бути першочерговим — підвищення внутрішньосудинного артеріального тиску чи ушкодження ендотеліальної регуляції судин. Отже, прискіплива увага до вивчення порушень метаболізму NO, встановлення різних ланок і засобів впливу на баланс між ферментами ендотелію цілком слушна. Вирішенню саме цих проблем і присвячене наше дослідження.

Методика

Досліди виконані на щурах з нормальним рівнем системного артеріального тиску (САТ) — нормотензивні щури (I група) і щурах з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією — спонтанно гіпертензивні щури (II група). САТ вимірювали неінвазивним фотоплетизмографічним методом у хвостовій артерії наркотизованих нембуталом (40 мг/кг внутрішньоочеревинно) дорослих щурів.

На ізольованих препаратах грудної аорти в ізометричному режимі реєстрували скорочувальну активність гладеньких м'язів (ГМ). Судини нарізали під кутом 45° на сегменти завширшки 2–2,5 мм і масою 2–4 мг. Кільцевий сегмент поміщали в експериментальну камеру в стандартний розчин Кребса ($35–36^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,4$), де його піддавали пасивному розтягненню з силою 7–15 мН. Скорочувальну активність ГМ реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX 1С [31].

Амплітуду змін тонічного напруження ГМ грудної аорти вимірювали у відсотках від рівня «плато» їх скорочувальної реакції на норадреналін, значення якої приймалося за 100 %. Латентний період розвитку реакції вимірювали в секундах. В роботі були використані норадреналін (НА) і ацетилхолін (АХ) фірми «Serva» (ФРН).

Біохімічні показники, що характеризують інтенсивність обміну L-аргініну по окисному та неокисному шляхах, вимірювали в гомогенатах серця, аорти, плазмі крові й еритроцитах. Визначали активність ферментів: синтази оксиду азоту (NOS) та аргінази, а також вміст продуктів кожної реакції, стабільного метаболіту оксиду азоту — нітрит-аніону (NO_2^-) і сечовини відповідно.

Активність NOS визначали за вмістом NO_2^- колориметричним методом [9]. Інкубаційна суміш складалася з 50 ммоль/л HEPES ($\text{pH } 7,4$), 1 ммоль/л НАДФН, 1 ммоль/л EDTA, 1,26 ммоль/л CaCl_2 , 1 ммоль/л L-аргініну. Активність аргінази визначали за вмістом сечовини спектрофотометричним методом [14]. Інкубаційна суміш містила 10 ммоль/л L-аргініну в 5 ммоль/л бікарбонатному буфері $\text{pH } 9,5$.

Вміст NO_2^- визначали в безбілкових зразках проб за допомогою реактиву Гріса спектрофотометричним методом [15]. Вміст сечовини визначали в безбілкових зразках проб колориметричним методом за кольоровою реакцією з диацетилмонооксимом [4]. Білок у досліджуваних пробах визначали за методом Бредфорда.

Результати та їх обговорення

У нормотензивних щурів (І група) рівень САТ дорівнював у середньому 114,0 мм рт. ст. \pm 12,0 мм рт. ст. Серед спонтанно гіпертензивних щурів (ІІ група) виявилися тварини з різним значенням САТ, тому вони, в свою чергу, розподілилися на дві підгрупи: 1-ша — тварини, у яких САТ не перевищував 120 мм рт. ст. і 2-га — тварини з високим рівнем САТ, що коливався від 145 до 155 мм рт. ст. (в середньому $152,5 \pm 3,4$).

Встановлено, що у І групі АХ в концентрації 10^{-6} моль/л завжди викликав залежне від ендотелію розслаблення ГМ грудної аорти, які попередньо були активовані НА (10^{-6} моль/л). Амплітуда його в середньому дорівнювала $65 \% \pm 3,5 \%$ від скорочення ГМ на НА. Латентний період розвитку цієї реакції був $35 \text{ с} \pm 1,5 \text{ с}$ (рис. 1).

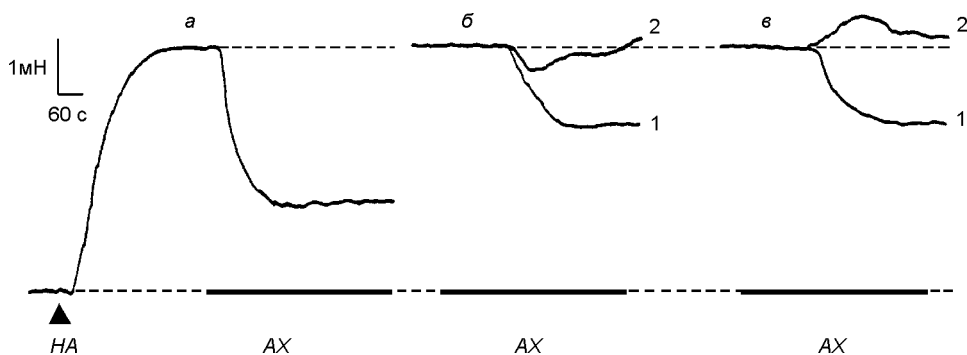


Рис. 1. Вплив ацетилхоліну (АХ, 10^{-6} моль/л) на преактивовані норадреналіном (НА, 10^{-6} моль/л) гладенькі м'язи (ГМ) грудної аорти щурів з різним рівнем системного артеріального тиску: *а* — нормотензивні щури; *б* — спонтанно гіпертензивні щури, 1-а підгрупа; *в* — спонтанно гіпертензивні щури, 2-а підгрупа. Темна лінія під кривими відповідає тривалості дії АХ. Пунктирна лінія знизу відповідає вихідному рівню тонічного напруження ГМ, зверху — заданому рівню їх активації, що приймається за 100%, після додавання в буферний розчин НА. 1,2 — різні типи реакцій ГМ на АХ.

У щурів ІІ групи 2-ї підгрупи ($n = 19$) реакції ГМ грудної аоти на АХ у тій же концентрації суттєво відрізнялися від таких у нормотензивних щурів (див. рис. 1). Тільки у 53 % експериментів зберігалася типова реакція ГМ на АХ. Проте амплітуда розслаблення знижувалася майже вдвічі і не перевищувала в середньому $36,4 \% \pm 7,4 \%$, а латентний період цієї реакції збільшувався у 4 рази і становив у середньому $159,2 \text{ с} \pm 32,8 \text{ с}$. В інших експериментах реєструвалися виключно реверсовані реакції. ГМ у таких випадках відповідали двофазною констрикторно-дилататорною реакцією з амплітудою кожної з фаз не більше ніж 30 %, або стійким скороченням, що на 15–25 % перевищувало заданий рівень їх активації. Іноді зміни тонічного напруження ГМ на АХ взагалі не розвивалися.

Щурам II групи 1-ї підгрупи ($n = 15$) були притаманні всі вищезгадані порушення судинних реакцій на АХ. Розслаблення ГМ грудної аорти відтворювалося тільки у 30% експериментів і в середньому становило $35,0 \% \pm 6,3 \%$ з латентним періодом $167,5 \text{ с} \pm 50,5 \text{ с}$. У 8 дослідах воно взагалі не розвивалося, а в 3 замість нього реєструвалося скорочення ГМ з амплітудою 20–25% (див. рис. 1).

В серці спонтанно гіпертензивних щурів обох підгруп виявлена значна активація неокисного шляху обміну L-аргініну. Так, активність аргінази підвищилася від $1,32 \pm 0,12$ у нормотензивних щурів до $2,23 \pm 0,62$ (1-ша підгрупа) і $27,96 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 5,92 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка}$ (2-га підгрупа). Концентрація внутрішньоклітинних пулів сечовини збільшувалася від $36,8 \pm 5,3$ до $121,14 \pm 27,69$ і $679,5 \text{ нмоль/мг білка} \pm 121,19 \text{ нмоль/мг білка}$ відповідно. Разом з тим, окисний метаболізм L-аргініну в серці щурів обох підгруп помітно знижувався. Активність NOS зменшувалася від $0,093 \pm 0,014$ (I група) до $0,022 \pm 0,007$ нмоль/хв · мг білка і $0,018 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 0,005 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка}$ у 1-й і 2-й підгрупах II групи відповідно. Незважаючи на це, вміст NO_2^- у щурів II групи підвищився у 1-й підгрупі до $0,341 \text{ нмоль/мг білка} \pm 0,081 \text{ нмоль/мг білка}$ і у 2-й підгрупі – $0,63 \text{ нмоль/мг білка} \pm 0,13 \text{ нмоль/мг білка}$ порівняно з таким у тварин I групи $0,264 \text{ нмоль/мг білка} \pm 0,04 \text{ нмоль/мг білка}$ (рис. 2).

В аорті щурів II групи також реєстрували підвищення активності аргінази від $1,12 \pm 0,07$ (I група) до $4,74 \pm 0,99$ нмоль/хв · мг білка в щурів 2-ї підгрупи, а в 1-й підгрупі несподівано ще більше – $12,47 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 5,08 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка}$. Таку ж спрямованість мали зміни вмісту сечовини від $43,02 \pm 9,55$ у нормі до $350,6 \text{ нмоль/мг білка} \pm 63,6 \text{ нмоль/мг білка}$ і $422,78 \pm 56,56 \text{ нмоль/мг білка}$ у 2-й і 1-й підгрупах. В аорті щурів 1-ї підгрупи активність NOS зменшувалася до $0,31 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 0,10 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка}$, а в 2-й підгрупі – до $0,18 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 0,04 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка}$ (проти $0,41 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 0,07 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка}$ в нормі). Вміст NO_2^- також зменшувався у щурів 1-ї і 2-ї підгруп до $0,87 \pm 0,18$, $0,79 \text{ нмоль/мг білка} \pm 0,06 \text{ нмоль/мг білка}$ відповідно (порівняно з $2,15 \text{ нмоль/мг білка} \pm 0,18 \text{ нмоль/мг білка}$ у нормотензивних щурів) (рис. 3).

В плазмі спонтанно гіпертензивних щурів обох підгруп також виявлено підвищення аргіназної активності та вмісту сечовини. Так, якщо в нормі активність ферменту становила $65,18 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 10,56 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг}$, то у тварин 1-ї підгрупи вона сягала $229,41 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг} \pm 52,62 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг}$, а в 2-й підгрупі – $236,72 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг} \pm 30,77 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг}$. Вміст сечовини у щурів цих груп був $3554,0 \pm 378,0$, $6355,6 \pm 839,8$ (1-ша підгрупа), $6661,0 \text{ нмоль/мл} \pm 588,0 \text{ нмоль/мл}$ (2-га підгрупа). Активність NOS у плазмі зменшувалася від $0,787 \pm 0,03$ у нормі, до $0,534 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг} \pm 0,07 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг}$ у тварин 1-ї підгрупи і $0,716 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг} \pm 0,07 \text{ нмоль/хв} \cdot \text{мг}$ у 2-й підгрупі. Вміст NO_2^- у щурів 1-ї і 2-ї підгруп сягав $7,70 \pm 1,59$ і $5,56 \text{ нмоль/мл} \pm 0,36 \text{ нмоль/мл}$ відповідно (порівняно з $13,08 \text{ нмоль/мл} \pm 1,75 \text{ нмоль/мл}$ в нормі).

В еритроцитах тварин II групи обох підгруп також відбувалась активація неокисного шляху обміну L-аргініну. Активність аргінази підвищилася

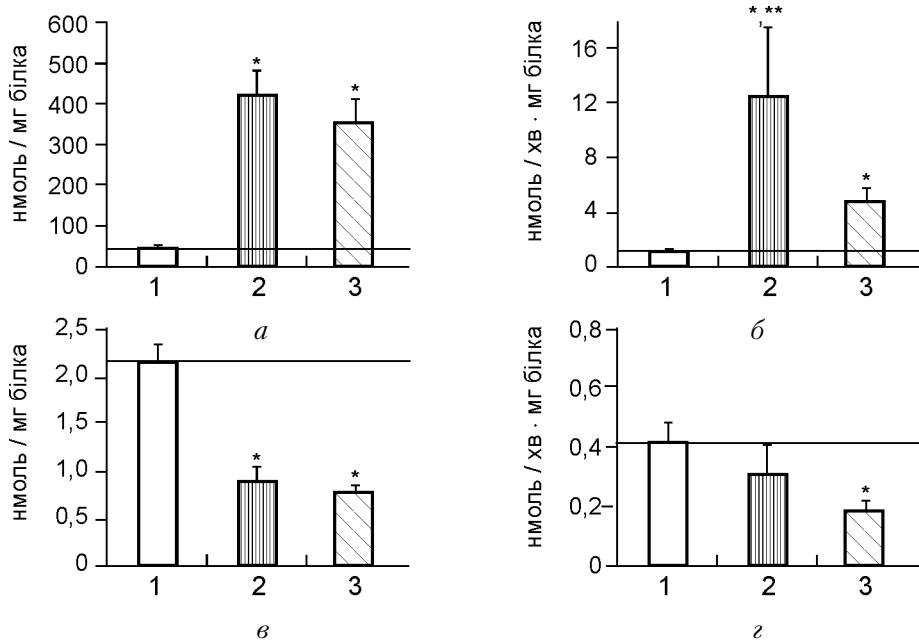
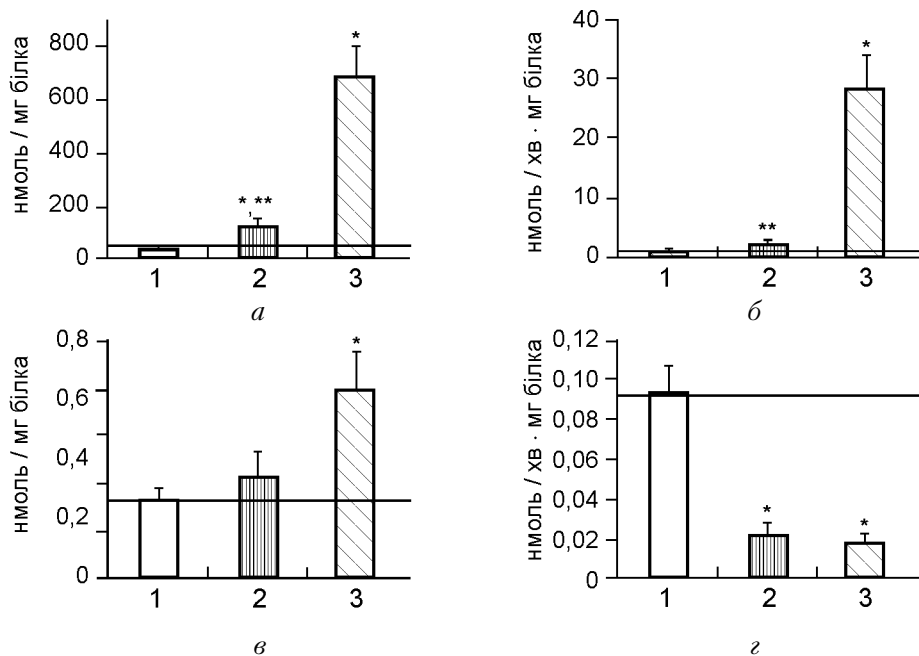


Рис. 2. Зміни активності ферментів ендотелію і продуктів їх метаболізму в серці (А) і аорті (Б) щурів з різним рівнем системного артеріального тиску (1 – нормотензивні щури, 2 – спонтанно гіпертензивні щури, 1-а підгрупа; 3 – спонтанно гіпертензивні щури, 2-а підгрупа; а – сечовина, б – аргіназа, в – NO_2^- , г – NOS. * – різниця вірогідна по відношенню до значення при нормотензії; ** – різниця вірогідна по відношенню до значення при гіпертензії, $P < 0,05$.

від $28,5 \pm 7,13$ (I група) до $30,64 \pm 2,49$ (1-ша підгрупа) і $34,95$ нмоль/хв · мг $\pm \pm 3,16$ нмоль/хв · мг (2-га підгрупа). Вміст сечовини в еритроцитах цих тварин змінювався від $234,7 \pm 48,7$ до $741,7 \pm 210,19$, 2608 нмоль/мг $\pm 64,12$ нмоль/мг відповідно. У щурів 1-ї підгрупи активність NOS знижувалася (з $0,61 \pm 0,04$ до $0,22$ нмоль/хв · мг $\pm 0,05$ нмоль/хв · мг), проте у тварин 2-ї підгрупи підвищувалася до $0,9$ нмоль/хв · мг $\pm 0,05$ нмоль/хв · мг. Незважаючи на це, вміст NO_2^- у щурів 1-ї підгрупи сягав $4,034 \pm 0,82$, а в 2-й підгрупі — $5,47$ нмоль/мг білка $\pm 0,11$ нмоль/мг білка (проти $1,65$ нмоль/мг $\pm \pm 0,34$ нмоль/мг білка в нормі).

Таким чином, отримані результати не тільки підтверджують дані наших попередніх досліджень про активацію неокисного (аргіназного) й інгібування окисного (NO-синтазного) шляху обміну L-аргініну в аорті щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією [2, 6]. Вони свідчать про існування таких змін у серці, плазмі й еритроцитах. Подібне підвищення аргіназної активності в аорті щурів виявляється також при ДОСА-сольовій гіпертензії [27]. Як свідчать результати нашої роботи у щурів з високим рівнем САТ у всіх досліджуваних тканинах збільшується активність аргінази та вміст сечовини. Разом з тим, у серці, аорті та плазмі активність NOS зменшується, тоді як в еритроцитах несподівано підвищується. Вміст NO_2^- в аорті і плазмі зменшується більше ніж удвічі, а в серці й еритроцитах, навпаки збільшується. Подібне підвищення значення цього показника в серці реєструється при атеросклерозі і надзвичайно важливо в його патогенезі [8]. Збільшення вмісту NO_2^- в еритроцитах свідчить, певно, про безпосередню участь їх у регуляції тонуусу судин не тільки внаслідок звільнення АТФ чи аденозину [28], а і завдяки звільненню NO [12]. Аналіз співвідношень активності ферментів і продуктів їх реакції — аргіназа/NOS та сечовина/ NO_2^- в наших дослідах також доводить, що є зміни пріоритетів у метаболізмі L-аргініну при артеріальній гіпертензії (таблиця). Найбільше підвищення значень цих співвідношень реєструється в серці й аорті. Дослідження показали, що у щурів з високим рівнем САТ істотно порушуються вазодилататорні реакції ГМ, що реалізуються за участю ендотелію. Майже вдвічі знижується амплітуда розслаблення грудної аорти на АХ, і в 4 рази підвищується латентний період. У щурів цієї ж лінії, що мають низький рівень САТ виявлено якісно подібні, але кількісно менші зрушення. В серці, аорті, плазмі й еритроцитах також активується неокисний шлях обміну L-аргініну — збільшується

**Співвідношення аргіназа/NOS і сечовина/ NO_2^-
у щурів з різним рівнем системного артеріального тиску**

Група тварин	Аргіназа/NOS		Сечовина/ NO_2^-	
	Серце	Аорта	Серце	Аорта
Нормотензивні щури (I група)	$14,19 \pm 1,23$	$2,73 \pm 0,47$	$139,39 \pm 22,00$	$20,01 \pm 5,00$
Спонтанно гіпертензивні щури (II група)				
1-ша підгрупа	$296,41 \pm 117,37$	$98,34 \pm 11,00$	$487,11 \pm 166,60$	$427,42 \pm 79,16$
2-га підгрупа	$1553,30 \pm 125,00$	$25,90 \pm 10,28$	$1078,60 \pm 122,00$	$443,80 \pm 45,30$

активність аргінази та вміст сечовини. Окисний шлях у цих тканинах інгібується. Так, активність NOS у серці, аорті, плазмі й еритроцитах зменшується. Зміни вмісту NO_2^- мають таку ж спрямованість, що і у тварин високим рівнем САТ, тобто в аорті та плазмі концентрація нітрит-аніону зменшується, а в серці й еритроцитах підвищується.

Отже, при артеріальній гіпертензії активність ферментів ендотелію, що мають спільний субстрат — L-аргінін, змінюється, а відтак, порушується і баланс між ними. Причиною різкого підвищення активності аргінази при гіпертензії може бути міграція з макрофагів у стінку судин трансформуючого фактора росту, що одночасно є також інгібітором активності iNOS [11, 17]. Вважають, що зменшення синтезу NO при гіпертензії є наслідком прямого пригнічення iNOS продуктом аргіназної реакції — сечовиною [25], або збільшенням концентрації циркулюючого асиметричного диметиларгініну — досить ефективного інгібітора eNOS і nNOS [10]. Ці два ферменти кальцій-залежні, синтезуються в стінці судин і експресуються постійно. Фосфорилювання eNOS за серином призводить до звільнення його з мембрани, що супроводжується зменшенням її активності. Є дані на користь стимуляції активності eNOS за тирозином. З іншого боку відомо, що фосфорилювання тирозину стимулює зв'язування eNOS з білком кавеоліном, який знижує її активність. Комплекс eNOS — кавеолін під впливом внутрішньоклітинного Ca^{2+} може дисоціювати і реасоціювати. Кальціймобілізуючі агоністи викликають дисоціацію комплексу, вихід eNOS із кавеол і його активацію. При відновленні концентрації Ca^{2+} до базального рівня виникає реасоціація кавеоліну і eNOS, повернення його до кавеол та пригнічення активності ферменту [13]. Не виключено, що якийсь з вищезгаданих процесів має пряме відношення до виявленого нами пригнічення активності NOS при гіпертензії. Внаслідок цих якісних змін ферментативної активності в судинах гіпертензивних щурів пригнічуються залежні від ендотелію дилататорні реакції. При цьому, підвищується рівень вазоконстрикторних речовин ендотеліального походження — ендотеліну та сечовини [2, 21]. Порушення балансу між ними може бути серйозним фактором ризику розвитку спастичних реакцій судин.

Аналіз отриманих результатів дає підставу вважати, що першопричиною підвищення артеріального тиску у спонтанно гіпертензивних щурів, є генетично та кількісно детерміновані ушкодження біохімічного гомеостазу, а також залежної від нього ендотеліальної регуляції судин. Підтвердженням цього є той факт, що гіпертензію можна відтворити за допомогою блокатора NOS метилового ефіру N^{ω} -нітро-L-аргініну. Навіть одноразове його введення значно підвищує жорсткість судин [7]. Тривале (протягом 3 тиж) пригнічення синтезу NO призводить до підвищення артеріального тиску [18]. Така модель гіпертензії тепер інтенсивно вивчається. Нами вперше на моделі артеріальної гіпертензії досліджено активність двох альтернативних шляхів метаболізму L-аргініну. Доведено важливість аргіназного шляху в регуляції серцево-судинної системи. Це відкриває широкі можливості для цілеспрямованої корекції виявлених ушкоджень.

V. F. Sagach, O. V. Bazilyuk, A. V. Kotsyuruba, A. M. Buchanevich

DISTURBANCE OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASCULAR RESPONSES, ARGINASE AND NO-SYNTASE PATHWAYS OF L-ARGININE METABOLISM AT SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

In normotensive rats (NTR) and spontaneously hypertensive rats (SHR) with high (subgroup 1) and low (subgroup 2) level of the systemic arterial pressure (SAP) we studied an activity of arginase and nitric oxide synthase (NOS) in different tissues, and the content of their metabolites: urea and nitrit anion (NO_2^-). In isolated preparations of a thoracic aorta we recorded endothelium-dependent (ED) dilator reactions on acetylcholine (Ach). It has been found that in heart, aorta, plasma and erythrocytes of rats (subgroup 2) both the activity of arginase and content of urea increase remarkably. In heart, the activity of arginase reaches $27,96 \pm 5,92 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, in aorta $4,74 \pm 0,99 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein (as compared with NTR $1,32 \pm 0,12 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein and $1,12 \pm 0,07 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, accordingly). Content of urea in heart reaches $679,5 \pm 121,19 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, in aorta $350,6 \pm 63,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein (in NTR it was $36,8 \pm 5,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein and $43,02 \pm 9,55 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, accordingly). It was followed with a decrease in the NOS activity and heterogenous changes in NO_2^- content in the tissues under exploration. For example, the activity of NOS in heart and aorta decreased to $0,018 \pm 0,005 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, in aorta $0,183 \pm 0,037 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, accordingly, as compared to $0,093 \pm 0,014 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein and $0,41 \pm 0,07 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein in NTR. Content of NO_2^- in aorta decreased by $0,79 \pm 0,06 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, but in heart it increased to $0,63 \pm 0,13 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, (in NTR it was $2,15 \pm 0,18 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein and $0,264 \pm 0,04 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, accordingly). In rats, subgroup 2, ED dilator responses of the smooth muscle (SM) of the thoracic aorta were inhibited by Ach (10^{-6} mol). Their amplitude reduced by almost twice, and a latency for their response became 4 times as much. All the changes in the biochemical parametres in heart, aorta, plasma and erythrocytes, and changes in contractile activity of vascular SM proved to be also characteristic for rats in subgroup 1, but they were less expressed quantitatively.

Thus, for the first time we have studied an activity of two alternative pathways for the metabolism of L-arginine on the model of arterial hypertension. The data obtained evidence that at hypertension non-oxidative (arginase) pathway of L-arginine metabolism is activated, while the oxidative pathway (NOS) is inhibited. Changes in the balance between them are followed with an essential inhibition of ED vasodilator responses. All this give us the prove to think of the origin for the arterial pressure increase to be both genetically and quantitatively determined damages in the biochemical homeostasis and dependent on it endothelial regulation of vascular tone.

*A. A. Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Базилук О. В., Берштейн С. А.* Модулирование эндотелием реакций гладких мышц артерий на биологические амины // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 1989. — **75**, №6. — С. 819-823.
2. *Базилук О. В., Коцюруба А. В.* Нові механізми порушення ендотеліальної регуляції судинного тонуусу при гіпертензії // Фізіол. журн. — 1998. — **44**, №3. — С. 95.

3. Кения М. В., Лукаш А. И., Гуськов Е. П. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи. соврем. биологии. — 1993. — **113**, №4. — С.456-470.
4. Колб В. Г., Камышников В. С. Определение мочевины в сыворотке крови и моче по цветной реакции с диацетилмонооксимом. — В кн.: Клиническая биохимия. — Минск: Беларусь, 1976. — С. 41-43.
5. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Шугалей В. С., Бондаренко Т. И. Аминокислоты, их производные и регуляция метаболизма. — Ростов.: Изд-во Ростов. ун-та. — 1983. — 111 с.
6. Сагач В. Ф., Базилюк О. В., Коцюруб А. В. Дисфункция эндотелия как следствие изменения его ферментативной активности при артериальной гипертензии. — В кн.: Роль монооксида азота в процессах жизнедеятельности.- Минск: Беларусь, 1998. — С. 144-146.
7. Сагач В. Ф., Ткаченко М. М., Шаповал М. В. Залежність довжина-сила судинних гладеньких м'язів та система оксиду азоту за умов хронічного дефіциту мезостриатного дофаміну // Фізіол. журн. — 1999. — **45**, №6. — С. 3-11.
8. Стокле Ж. К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов // Биохимия. — 1998. — **63**, №7. — С.976-983.
9. Bredt D. S., Snyder S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1990. — **87**, №2. — P.682-685.
10. Böger R., Bode-Böger S., Szuba A. et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction // Circulation. — 1998. — **98**, №18. — P1842-1847.
11. Boutard V., Havouis R., Fouqueray B. et al. Transforming growth factor- β stimulates arginase activity in macrophages // J. Immunol. — 1995. — **155**, №4. — P.2077-2084.
12. Chen L. Y., Mehta J. L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function // J. Cardiovasc.Pharmacol. — 1998. — **32**, №1. — P.57-61.
13. Feron O., Saldana F., Michel J. B., Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle // J. Biol. Chem. — 1998. — **273**, №6. — P.3125-3128.
14. Garganta C. L., Bond J. S. Assay and kinetics of arginase // Anal. Biochem. — 1982. — **126**, №1. — P.131-138.
15. Green L. C., David A. W., Glogovski J. Analysis of nitrate, Nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. — 1982. — **126**, №1. — P.131-138.
16. Ignaro L. J. Biological action and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein // Circulat. Res. — 1989. — **65**. — P. 1-21.
17. Junjero D. C., Shini V. B., Scott-Burden J., Vanhoutte P. M. TGF- β 1 inhibits L-arginine-derived relaxing factor(s) from SMC // Amer. J. Phisiol. — 1992. — **262**. — H1788.
18. Kalliovalkama J., Jolma P., Tolvanen J. P. et al. Arterial function in nitric oxide-deficient hypertension: influence of long-term angiotensin II receptor antagonism // J. Hypertension. — 1999. — **34**, №4, Pt.1. — P.552-557.
19. Lim J., Gasson C., Kaji D. M. Urea inhibits NaK_2Cl cotransport in human erythrocytes // J. Clin. Invest. — 1995. — **96**. — P.2126-2132.
20. Luscher T.F., Dohi Y. Endothelium-derived relaxing factor and endothelin in hypertension // News in Physiol. Sciences (NIPS). — 1992. — **7**. — P. 120-123.
21. Luscher R. F., Vanhoutte P. M. Endothelium-dependent contraction to acetylcholine in the aorta of spontaneously hypertensive rats // J. Hypertension. — 1986. — **8**. — P.344-348.
22. McHugh J., Cheek D. J. Nitric oxide and regulation of vascular tone: pharmacological and physiological consideration // Amer. J. Crit. Care. — 1998. — **7**. — P.131-140.

23. *Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A.* Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* — 1991. — **43**, №2. — P. 109-142.
24. *Pollock D. M., Keith T. L., Highsmith R. F.* Endothelium receptors and calcium signals // *FASEB J.* — 1995. — **9**. — P.1176-1204.
25. *Prabhakar S. S., Zeballos G. A., Montoya-Zavala M., Leonard C.* Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line // *Amer. J. Physiol.* — 1997. — **273**, №6. — P. 1882-1888.
26. *Rajagopalan K. V., Fridovich I., Handler P.* Competitive inhibition of enzymic activity by urea // *J. Biol. Chem.* — 1963. — **236**. — P.1059-1065.
27. *Rodriguez S., Richert L., Berthelot A.* Increased arginase activity in aorta of mineralocorticoid-salt hypertensive rats // *Clin. Exp. Hypertens.* — 2000. — **22**, №1. — P.75-85.
28. *Sprague R. S., Ellsworth A. H., Lonigro A. J.* ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation // *Amer. J. Physiol.* — 1996. — **271**. — H2717-H2722.
29. *Srivastava P., Hegde L. G., Patnaik G. K., Dikshit M.* Role of endothelial-derived reactive oxygen species and nitric oxide in norepinephrine-induced rat aortic ring contractions // *Pharmacol. Rev.* — 1998. — **38**, №4. — P. 265-274.
30. *Soloviev A. I., Bershtein S. A.* The contractile apparatus in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats posses increased calcium sensitivity: the possible role of protein kinase C // *J. Hypertension.* — 1992. — **10**. — P.131-136.
31. *Soloviev A. I., Stefanov A. V., Bazilyuk O. V., Sagach V. F.* Phospholipid vesicles (liposomes) restore endothelium-dependent cholinergic relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rats // *Ibid.* — 1993. — **11**. — P.623-627.
32. *Takata J., Koga T., Kobayashi K. et al.* Decrease in endothelium-dependent hypotension in spontaneously hypertensive rats // *Jap. Circulat. J.* — 1990. — **54**. — P. 183-191.
33. *Winquist R. J., Bunting P. B., Baskin E. P., Wallace A. A.* Decreased endothelium-dependent relaxation New Zealand genetic hypertensive rats // *J. Hypertension.* — 1984. — **2**. — P. 541-545.
34. *Zhang Z., Cohen D. M.* Urea activates ribosomal S6 kinase (RSK) in a MEK-dependent fashion in renal m1MCD3 cells // *Amer.J.Physiol.* — 1998. — **274**, №1. — F73-F78.

*Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 20.04.2000*