

В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк, Л.Г. Степаненко, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрuba

Вплив еналаприлу на синтез оксиду азоту, окисний метаболізм і тонус судин у старих щурів

Установлено, що з віком порушуються ендотеліязалежні реакції розслаблення гладких м'язів (ГМ) аорти, що являється реальним фактором розвитку вазоспастических реакцій. Ця дисфункція ендотеліа обумовлена утилізацією L-аргініну для синтезу карбаміда і поліамінів, збільшенням індукційного (iNOS) de novo і реутилізаційного (нітратредуктаза) синтезу NO, а також зниженням його конституційного de novo синтезу шляхом автоінгібування високим вмістом NO, мочевої кислоти і нітрозотіолов, збільшенням генерації активних форм кисню. Інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) еналаприл у старих щурів знижує активність індукційного і реутилізаційного синтезу NO, вміст мочевої кислоти (генерацію $\cdot O_2^-$) і нітрат-аніона (формування і деградацію пероксинітриду), тим самим відновлює конституційний синтез NO в серцево-судинній системі завдяки зняттю його автоінгібування і збільшенню доступності L-аргініну для синтезу NO. Внаслідок цього у старих щурів функція ендотеліа відновлюється, о чому свідчать нормалізація амплітуди ендотеліязалежних реакцій ГМ грудної аорти на ацетилхолін хлорид. Таким чином, нами встановлено, що еналаприл являється не тільки інгібітором АПФ, але і досить ефективним антиоксидантом і модулятором синтезу NO. Він може бути використаний для нормалізації ендотеліального компонента регуляції судинного тону.

ВСТУП

Відомо, що при артеріальній гіпертензії, атеросклерозі, опроміненні, хворобі Паркінсона тощо, з віком змінюється біохімічний та фізіологічний гомеостаз серцево-судинної системи. Посилюється активність кальційнезалежної індукційної NO-синтази (iNOS) і, навпаки, зменшується активність кальційзалежної ендотеліальної (eNOS), незважаючи на підвищення її експресії. Утворюється дефіцит оксиду азоту, а відтак, порушується ендотеліа та NO-залежний компонент регуляції судинного тону. Більше того, підвищується чутливість ендотеліа до вазоконстрикторної дії деяких агоністів, наприклад ангіотензину II, помітно активуються вільнорадикальні процеси, окисний і неокисний

катаболізм, у тому числі аргініну [2–7, 14]. Серед численних засобів, вплив яких супроводжується активацією NO-продукції й антиоксидантних ферментів, чинне місце займають інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту еналаприл та блокатор рецепторів ангіотензину II лосартан [19, 29]. Проте багато питань щодо вікових змін участі NO і активних метаболітів кисню у регуляції тону судин усе ще залишаються нез'ясованими.

Метою нашого дослідження було встановити ефективність використання інгібітора ангіотензинперетворюючого ферменту еналаприлу для нормалізації ушкодженого з віком ендотеліального компонента регуляції судинного тону, а також виявити біохімічні механізми цієї дії, в тому числі через можливу модуляцію окисного та

© В.Ф. Сагач, О.В. Базілюк, Л.Г. Степаненко, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюрuba

неокисного метаболізму аргініну, реутилізаційного та *de novo* синтезу NO, окисного метаболізму в цілому і зміни пулів стабільних метаболітів NO (низько- і високомолекулярні нітрозотіоли, нітрит- і нітрат-аніони).

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на щурах лінії Вістар – Кіото віком від 6 до 8 міс і 21–22 міс. Старі щури щоденно з їжею отримували еналаприл («Здоров'я», Україна) в дозі 20 мг/кг протягом 30 діб (I серія) та 55 діб (II серія).

Фізіологічні дослідження. Для цих досліджень у щурів виділяли грудну аорту, нарізали на кільцеві сегменти і за загальноприйнятою методикою в режимі, що наближався до ізотонічного, реєстрували скорочувальну активність гладеньких м'язів (ГМ) на ендотелійзалежний (ацетилхолін йодид, 10^{-6} моль/л, «Sigma», США) та ендотелійнезалежний (нітропрурид натрію, 10^{-4} моль/л, «Sigma», США) агоністи [27]. Попередню активацію ГМ забезпечували додаванням у буферний розчин Кребса норадреналіну (10^{-5} моль/л, «Sigma», США). Від сталого рівня скорочення ГМ на дію норадреналіну (рівень ІплатоI), що приймали за 100 %, проводили всі розрахунки змін амплітуди реакцій на досліджувані подразники.

Біохімічні дослідження. Біохімічні показники визначали у гомогенатах серця й аорти, а також у плазмі та еритроцитах. Еритроцити виділяли центрифугуванням (5 хв при 2000 хв^{-1}) і тричі промивали. Після останньої промивки їх розводили до концентрації $5 \cdot 10^7$ клітин/мл. Підрахунок числа клітин проводили спектрофотометричним методом, вимірюючи екстинцію при 640 нм. Плазму розбавляли в 10 разів. Безбілкові розчини гомогенатів тканин серця і аорти, а також плазми і еритроцитів готували, осаджуючи білок рівним об'ємом 1 N HClO₄. Після витримання на холоді для повного осадження білків і центрифугування (3500 хв^{-1} , 10 хв) відбирали надосадову

кислоторозчинну безбілкову фракцію проб.

Визначення активності ізоферментів NOS. Для визначення сумарної кальцій залежної активності (ендотеліальної та нейрональної eNOS і nNOS відповідно) та кальційнезалежної iNOS використовували комбінацію класичного методу [26] і сучасну його модифікацію [16].

При визначенні загальної активності NOS (конститутивна та індуцибельна) аліквоти гомогенатів тканин, що містили 500–1000 мкг білка інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші наступного складу (мкмоль/мл): KН₂РO₄ – 50, MgCl₂ – 1, СаCl₂ – 2, НАДФН («Sigma», США) – 1, L-аргінін – 2, рН 7,0 протягом 60 хв при 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2 N HClO₄. Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо денатурований 2 N HClO₄ білок. Суміш центрифугували при 3500 хв^{-1} протягом 10 хв і в надосадовій безбілковій суміші визначали вміст L-цитруліну спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з антипірином. Чутливість методу – 0,2 мкг L-цитруліну у 1 мл.

Методика визначення активності iNOS аналогічна попередній за деякими відмінностями: для визначення активності кальційнезалежної NOS в інкубаційну суміш замість СаCl₂ додавали 2 мкмоль ЕДТА.

Сумарну конститутивну активність (eNOS і nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS. Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв у розрахунку на 1 мг загального білка у пробі.

Визначення НАДН-залежної нітратредуктазної активності. Її визначали в гомогенатах серця і аорти, суспензії еритроцитів і плазмі крові при наявності надлишку НАДН («Reanal», Угорщина) і нітрат-аніона (NaNO₃) [1]. Суміш (1 мл) інкубували при 37°C протягом 60 хв, зупиняли реакцію, додаючи 0,3 мл 2N HClO₄. Після центри-

фугування (3500 хв^{-1} , 10 хв) для видалення осаду білка в безбілковій надосадовій фракції визначали вміст залишкового нітрат-аніона.

Визначення активності аргінази. Базальну її активність визначали методом [8] за утворенням сечовини в інкубаційній суміші (1 мл), що містила L- аргінін і аліквоти проб у тріс-НCl (“Calbiochem”) буфері (рН 8,0). Інкубацію проводили при 37°C протягом 60 хв, реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2N HClO₄. Осад видаляли центрифугуванням і в надосадовій рідині визначали вміст сечовини, що утворилася.

Визначення вмісту нітрит-аніона (NO_2^-) Вміст NO_2^- визначали в безбілкових аліквотах проб у колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [20]. Реактив Гріса готували, змішуючи однакові частини 0,1%-го водного розчину нафтилетилендіаміндігідрохлориду (“Sigma”, США) з 1%-м розчином сульфаніламіну (“Sigma”, США) в 5 % H₃PO₄. Вміст NO_2^- визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням NaNO₂.

Визначення вмісту нітрозотіолів. Їх вміст визначали за методом Saville [17]. Загальний вміст нітрозотіолів визначали як різницю між вмістом NO_2^- до і після гідролізу S – NO-зв'язку іонами двовалентної ртуті, які додавали в реактив Гріса, в гомогенатах тканин, суспензії еритроцитів і в плазмі, а також окремо – вміст низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) у їх безбілкових фракціях. Вміст високомолекулярних нітрозотіолів (ВМНТ) визначали як різницю між загальним вмістом нітрозотіолів і вмістом НМНТ. Гідроліз білкових розчинів проб (гомогенати серця аорти, суспензія еритроцитів і плазма крові) здійснювали протягом ночі за наявності Hg²⁺, після чого в гідролізат додавали рівний об'єм 1 N HClO₄ для осадження білка, витримували на холоді, центрифугували для отримання безбілкових розчинів, в яких визначали вміст NO_2^- .

Визначення вмісту нітрат-аніону (NO_3^-) Вміст NO_3^- визначали бруциновим методом в безбілкових аліквотах проб за допомогою спектрофотометра [21]. Аліквоти проб інкубували при 100°C протягом 10 хв після чого охолоджували та визначали величину екстинції при довжині хвилі 405 нм. Бруциновий реактив готували, розчиняючи 60 мг бруцину (“Sigma”, США) у 100 мл 50%-ї сірчаної кислоти. Вміст NO_3^- визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням NaNO₃.

Визначення вмісту цитруліну. Його визначали колориметричним методом [12]. Безбілкові аліквоти проб змішували з 2 мл реагента (1 мл 59 ммоль/л діацетилмоноксиму (“Sigma”, США), 1 мл 32 ммоль/л антипірину (“Sigma”, США) та 55 мкмоль/л сульфату заліза в 6 N H₂SO₄), кип'ятили протягом 15 хв на водяній бані і після охолодження визначали величину екстинції при $\lambda = 465 \text{ нм}$. Вміст цитруліну визначали за калібрувальним графіком з використанням L-цитруліну.

Визначення вмісту сечової кислоти. Її визначали в колориметричній реакції в безбілкових розчинах гомогенатів тканин, плазми та еритроцитів крові за допомогою набору реактивів фірми “Філіст-Діагностика”, Україна. До аліквоти безбілкової проби додавали розчин карбонату натрію та фосфорновольфрамового реактиву зі стандартного набору. Інкубували суміш 30 хв при кімнатній температурі, потім визначали величину екстинції при $\lambda = 650 \text{ нм}$. Вміст сечової кислоти розраховували за екстинцією її стандартного розчину.

Визначення вмісту сечовини. Її вміст визначали колориметричним методом в безбілкових розчинах гомогенатів тканин, плазмі та еритроцитах за допомогою реактивів фірми “Філіст-Діагностика”, Україна. До суміші (1:1) розчинів діацетилмоноксима та тіосемікарбазида додавали 0,01 мл безбілкової проби. Отриману суміш витримували протягом 10 хв на киплячій водяній

бані, охолоджували та фотометрували при $\lambda = 500$ нм. Вміст сечовини розраховували, використовуючи оптичну густина калібрувальної проби.

Визначення вмісту білка. Його вміст визначали за методом Бредфорда з використанням барвника Cumassi G-250 ("Fe-rak", Німеччина).

Результати оброблено статистично з використанням комп'ютерних програм і виражено у відсотках до значень у дорослих тварин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фізіологічні дослідження. Встановлено, що попередньо активовані норадреналіном (10^{-5} моль/л) ГМ грудної аорти дорослих і старих щурів на ацетилхолін йодид (10^{-6} моль/л), часто реагували типовою реакцією – розслабленням, реалізація якого була залежна від ендотелію ($n=8$). Амплітуда такої реакції коливалася від 18 до 60 % (від сталого рівня їх активації), а в середньому становила $42,9 \pm 3,5$ порівняно з $66,3 \pm 3,0$ % у дорослих щурів. Отже, з віком амплітуда такої реакції зменшується більш ніж у 1,5 раза. Іноді замість розслаблення на цей агоніст ГМ відповідали стійким скороченням. На нітропрусид натрію ($n=8$) ГМ грудної аорти старих щурів, завжди реагу-

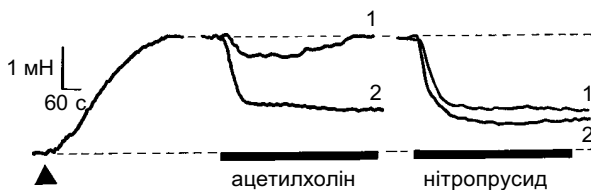


Рис. 1. Зміни ацетилхолін- та нітропрусидіндукованих скорочувальних реакцій преактивованих норадреналіном гладеньких м'язів грудної аорти старих щурів у контролі (1) та після тривалого введення еналаприлу (2). Темна лінія під кривими – тривалість дії ацетилхоліну йодиду та нітропрусиду натрію. Переривчаста – дає вихідний (внизу) рівень тонічного напруження гладеньких м'язів (ГМ) і заданий (зверху) рівень їх активації після введення норадреналіну, що приймається за 100%. Стрілкою позначено початок активації ГМ. Перерва між кривими – 5 хв

вали розслабленням, що, як і у дорослих щурів, не залежало від ендотелію. Амплітуда такої реакції в окремих дослідах сягала від 75 до 140 %, а в середньому – $109,6 \pm 4,3$ %. У дорослих щурів цей показник становив $87,4 \pm 2,4$ % (рис. 1).

У I серії дослідів після 30-добового вживання старими щурами еналаприлу ГМ грудної аорти ($n=9$) реагували типовими реакціями на дію ацетилхоліну – розслабленням. Амплітуда реакції порівняно з контролем, зростала більш ніж на 30 % і в середньому сягала $64,0 \pm 3,9$ %, тобто значень, що реєструвалася у дорослих щурів без дисфункції ендотелію. Ушкоджених чи реверсованих реакцій взагалі не було. Нітропрусид натрію ($n=5$) також викликав розслаблення ГМ (у середньому на $118,7 \pm 2,3$ %), що за амплітудою навіть на 10 % перевищувало середнє значення у старих щурів без дії інгібітора (див. рис.1).

У II серії дослідів 55-добове вживання еналаприлу не змінювало характеру реакцій на досліджувані агоністи і суттєво не поліпшувало показники, що реєструвалися в порівнянні з такими в I серії. А саме амплітуда ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ грудної аорти ($n=9$) коливалася від 53 до 110 %, та в середньому становила $63,9 \pm 4,4$ %. Амплітуда нітропрусидіндукованого розслаблення ГМ ($n=5$) зростала щодо контролю на 13% і в середньому становила $124,6 \pm 2,4$ %.

Біохімічні дослідження. Нами виявлено значну активацію iNOS у серці, аорті старих щурів (рис. 2). Вікова її гіперекспресія може бути зумовлена, на наш погляд, підвищеною генерацією супероксид аніона, який є ефективним підсилювачем індукції iNOS. Більше того, в цих умовах імовірна також автокаталізація індукції iNOS супероксидом, що може генеруватися eNOS за умов підвищеного синтезу NO ізоферментом iNOS та нітратредуктазою. Введення еналаприлу старим щурам призвело до повної нормалізації активності

iNOS в аорті. В серці вона зменшувалася майже вдвічі та залежала від тривалості введення препарату (див. рис.2).

Як відомо, активність eNOS контролюється не лише Ca^{2+} , але й багатьма іншими чинниками, наприклад інсуліном, а також локалізацією в клітині. Ми виявили, що активність eNOS в серці старих щурів пригнічена більше ніж у чотири рази (див. рис. 2). Еналаприл суттєво підвищував активність цього ферменту удвічі в серці та повністю нормалізував в аорті. З віком у деяких тканинах розвивається гіперекспресія не лише iNOS, але також і eNOS, хоч NO-синтезувальна активність останньої значно знижена. Цілком можливо, що в цих умовах eNOS частково переключається із синтезу NO на синтез супероксиду. Механізмом інгібування NO-синтезувальної активності eNOS може бути сам NO, утворений за дії як iNOS так і нітратредуктази, що також активована у старих тварин (див. рис. 2). Пригнічувальна дія еналаприлу на генерацію NO цими ферментами може нормалізувати NO-синтезувальну активність eNOS і тим самим відновлювати ендотеліальну функцію у старих тварин.

Слід відмітити, що в серці та аорті старих щурів активність НАДН-залежної

нітратредуктази значно вища за таку у дорослих тварин. Найбільші значення реєструються в аорті (більше ніж 1000 %; див. рис. 2). Це свідчить про інтенсифікацію реутилізаційного шляху синтезу NO із його окиснених стабільних метаболітів – нітрату та нітриту. Як відомо, цей шлях синтезу NO активується при гіпоксичних станах в умовах обмеження кисню, що є субстратом NOS. Еналаприл значно пригнічує активність нітратредуктази в аорті, тоді як у серці його дія протилежна – активність підвищується. Редуктазна активність (синтез через послідовне відновлення нітрату та нітриту) значно перевищує NO-синтазну активність (синтез внаслідок окиснення аргініну) як у дорослих, так і, особливо, у старих щурів [31]. Гіперпродукція NO в першому випадку може інгібувати NO-синтезувальну активність eNOS, тим самим викликаючи ендотеліальну дисфункцію.

Вимірювали також сумарну активність аргінази – конститутивної аргінази I та індукцйбельної аргінази II. Виявилось, що у старих щурів сумарна аргіназна активність (див. рис. 2) і вміст сечовини підвищені (рис. 4). Це зумовлює реципрокне зменшення синтезу NO не лише внаслідок утилізації L-аргініну чи інгібування його ресинтезу в цитруліновому циклі, але і за рахунок

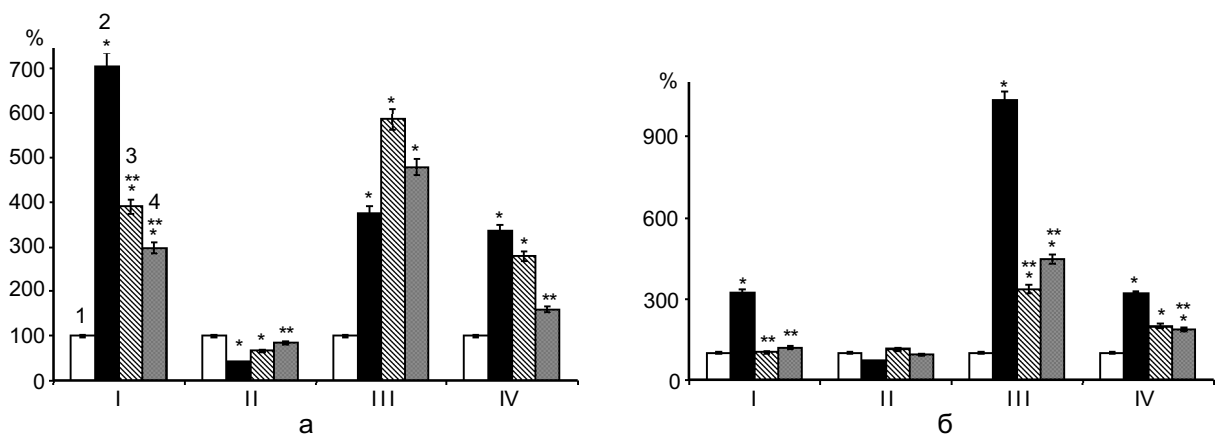


Рис. 2. Вплив еналаприлу на активність iNOS (I), eNOS (II), нітратредуктази (III) та аргінази (IV) в серці (а) та аорті (б) старих щурів: 1 – контроль, 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення еналаприлу протягом одного місяця, 4 – протягом двох місяців. *P<0,05 відносно контролю; **P<0,05 відносно старих тварин

прямого інгібування активності eNOS.

Основною причиною високої активності аргінази у старих щурів може бути гіперекспресія індукцйбельного мітохондріального ізоферменту аргінази одночасно із гіперекспресією iNOS. Чітко встановлена гіперекспресія iNOS при старінні, що робить високою ймовірною і гіперекспресію аргінази. В такому разі дія еналаприлу може полягати в інгібуванні експресії як iNOS так і аргінази, що і зумовлює зниження аргіназної активності та вмісту сечовини.

Зменшення вмісту L-аргініну, що є причиною зниження NO-синтезувальної активності eNOS, може виникати через інгібування його ресинтезу високими концентраціями сечовини [10]. Такий вплив сечовини на цитруліновий цикл полягає в пригніченні гідролізу аргініносукцинату. За окисного стресу, що спостерігається у старих тварин, аргініносукцинат неферментативно, за дії NO чи ·OH-радикала може перетворюватися у токсичну сполуку – гуанідиносукцинат (уремічний токсин). Більше того, високий вміст останнього може інгібувати не лише утворення L-аргініну, тобто конститутивний синтез NO, але і активність СОД, тим самим посилюючи утворення пероксинітриду [9].

У такому разі нормалізуюча дія еналаприлу може полягати в обмеженні вільнора-

дикальних процесів, у тому числі в усуненні токсичної дії гуанідиносукцинату та відновленні ресинтезу аргініну, що може відновити конститутивний *de novo* синтез NO в аорті і тим самим нормалізувати ендотеліза-лежні реакції.

Сечова кислота, як відомо, утворюється за дії ксантиноксидази одночасно із супероксид-аніоном. Вона розглядається як дуже важливий маркер порушень, що можуть розвиватися в серцево-судинній системі. Ми встановили, що з віком значно підвищуються пули сечової кислоти в еритроцитах, серці та аорті, меншою мірою в плазмі крові (див. рис. 4). Введення еналаприлу викликає зниження вмісту сечової кислоти, а отже і генерації O_2^- -ксантиноксидазою. Це також свідчить про те, що еналаприл проявляє антиоксидантні властивості.

Вазо- та кардіотоксична дія високого вмісту як сечовини, так і сечової кислоти у старих тварин, на відміну від антиоксидантної дії низьких фізіологічних концентрацій цих сполук, може бути зумовлена утворенням в умовах окисного стресу алоксану, який спричиняє порушення синтезу та секреції інсуліну – важливого ендогенного активатора eNOS у серці й аорті [15].

Нітрат-аніон, як відомо, є найбільш окисненим стабільним метаболітом оксиду

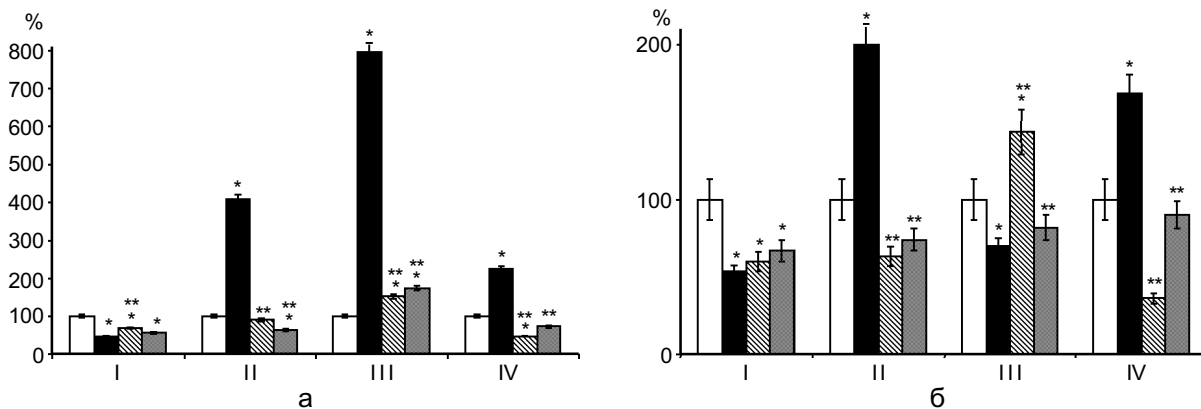


Рис. 3. Вплив еналаприлу на вміст нітрит-аніону (I), нітрат-аніону (II), низькомолекулярних (III) та високомолекулярних нітрозотолів (IV) в серці (а) та аорті (б) старих щурів: 1 – контроль, 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення еналаптілу протягом одного місяця, 4 – протягом двох місяців

азоту, а також субстратом нітратредуктази для ресинтезу NO. За нашими результатами, у старих щурів спостерігається значне підвищення пулів NO_3^- у серці, аорті (див. рис. 3). Цікаво, що повна нормалізація цього показника відбувалась у всіх тканинах вже після 30 добового введення еналаприлу. Такий рівень утримувався і надалі. Враховуючи той факт, що нітрат утворюється при метаболізмі пероксинітриду ($\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{ONOOH} \rightarrow \text{HNO}_3 + \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$) одночасно із вільними радикалами кисню та азоту ($\text{ONOOH} \rightarrow \cdot\text{NO}_2 + \cdot\text{OH}$), підвищення його вмісту у старих щурів свідчить не лише про активацію синтезу NO ізоферментом iNOS, але також і про активацію окисного метаболізму, тобто про підвищення генерації супероксид-аніона.

Таким чином, еналаприл у наших дослідах нормалізує не лише синтез de novo NO, але і проявляє антиоксидантну дію, інгібуючи утворення пероксинітриду внаслідок можливого пригнічення генерації супероксид-аніона ксантинооксидазою.

У наших дослідах пули нітрит-аніона у серці, аорті та плазмі старих щурів виявилися майже вдвічі нижче, ніж у дорослих, тоді як в еритроцитах їх вміст майже не відрізнявся від такого у дорослих тварин (див. рис. 3). Це відбувається на фоні зростання пулів нітрату. Отже, частка нітриду в сумарному пулі окиснених стабільних метаболітів NO з віком зменшується. Еналаприл суттєво підвищував вміст пулів NO_2^- в плазмі та еритроцитах і дещо в серці й аорті. Проте частка його значно збільшувалася у зв'язку зі зменшенням пулів нітрату.

Як відомо, при нормальній оксигенації саме нітрит-аніон є продуктом спонтанного окиснення NO. В свою чергу, нітрат-аніон – продукт ферментативного окиснення NO (наприклад, оксигемоглобіном) або спонтанної деградації пероксинітриду, а високий його вміст у старих щурів свідчить про підвищену генерацію O_2^- , тобто наявність

оксидативного стресу. Отже, зниження пулів NO_3^- в наших дослідах вказує на антиоксидантну дію еналаприлу, яка нормалізує як генерацію супероксиду, так і окисний катаболізм NO.

Відомо, що нітрозотіоли утворюються при окисненні SH-групи у складі низькомолекулярних (в основному глутатіон) чи високомолекулярних (білки, що містять залишки цистеїну) тіолів активними метаболітами азоту. Цей процес є зворотним. Таким чином, нітрозотіоли розглядаються як депо NO. Процес звільнення NO із нітрозотіолів («декомпозиція») здійснюється різними шляхами – ферментативним (наприклад, за дії ксантинооксидази, алкогольдегідрогенази тощо) та неферментативним (за дії Fe^{2+} чи Cu^{2+} як у вільному, так і у зв'язаному стані, наприклад, у складі ферменту СОД, трансферину, церулоплазміну тощо). Наші дослідження показали значне збільшення НМНТ у серці старих щурів (див. рис. 3). Це вказує на можливість накопичення в цих депо оксиду азоту, а також пригнічення процесу декомпозиції. В аорті, навпаки, цей показник, навіть зменшувався у порівнянні з дорослими щурами (див. рис. 3). Тривале введення еналаприлу нормалізувало вміст НМНТ у серці і не змінювало його в аорті.

Вміст ВМНТ в еритроцитах, меншою мірою в серці, в аорті та плазмі крові старих щурів, за нашими даними, виявився значно вищий, ніж у дорослих (див. рис. 3). Введення еналаприлу призводило до його зменшення. В інших тканинах вміст ВМНТ повністю відновлювався. Слід зазначити, що цей ефект еналаприлу більшою мірою проявляється вже через 30 днів в серці та, особливо, в аорті старих щурів.

Отже, ці результати дозволяють стверджувати, що старі щури мають значно посилений окисний метаболізм. Оскільки пули ВМНТ є ефективними донорами вільного NO, то зменшення їх утворення за дії еналаприлу в наших дослідах може

свідчити, з одного боку, про нормалізацію утилізації NO (його ефективності), з другого, про пригнічення окисного метаболізму у старих щурів.

Наші дослідження показали, що фактичне співвідношення в клітинах і органах неактивного (O_2) та активного (O_2^-) кисню – так званий „індекс оксигенації” (вміст нітриту/(вміст сечовини + вміст нітрату)) в серці, аорті, плазмі й еритроцитах старих щурів значно менше ніж у дорослих. Введення еналаприлу повністю нормалізує значення цього показника в плазмі крові і частково в еритроцитах. Разом з тим у серці й аорті його вплив виявився менш ефективним (рис.5).

Відомо, що NO та його метаболіти є важливими кардіо- та вазопротекторними сполуками, необхідними для функціонування різних тканин в умовах як фізіологічної норми, так і особливо при патофізіологічних станах, наприклад старінні, гіпоксії, атеросклерозі, гіпертензії тощо. Зазвичай основним шляхом синтезу NO в серцево-судинній системі є окисний метаболізм аргініну за дії кальційзалежної eNOS, в той час як за умов патології, наприклад при старінні – окисний метаболізм аргініну – за дії кальційнезалежної iNOS. З віком розвивається гіперекспресія eNOS так і iNOS, але при цьому активна лише остання.

Розглянемо можливі біохімічні механізми, що зумовлюють зміни експресії й активності різних ізоформ NOS при старінні.

Експресія iNOS індукується цитокінами (фактор некрозу пухлин α , інтерлейкін I β , інтерферон γ), а також стероїдними гормонами (наприклад, естрогеном) [28]. Зазвичай, рівень експресії iNOS невисокий, але при підвищенні вмісту цитокінів (запалення чи зростання вмісту екстрогену у жінок) експресія iNOS збільшується. Особливо високі рівні її спостерігаються при окисному стресі коли підвищується генерація O_2^- , який є підсилювачем експресії iNOS. З віком генерація O_2^- посилюється. Отже, окисний стрес, на нашу думку, є основною причиною гіперекспресії iNOS у серцево-судинній системі старих щурів.

Експресія eNOS запускається різними пептидними гормонами, в тому числі ангіотензином через рецептор ангіотензину II [25], інсуліном, VEGF, гіпоксією, напругою зсуву та іншими факторами, причому посилення експресії відбувається при підвищенні рівнів H_2O_2 [13]. У старих щурів окисний стрес може бути причиною гіперекспресії eNOS і iNOS. На відміну від останньої, активність eNOS не залежить від рівня експресії, а здійснюється внаслідок фосфорилування різними протеїнкіназами. Встановлено, що ендотеліальна дисфункція

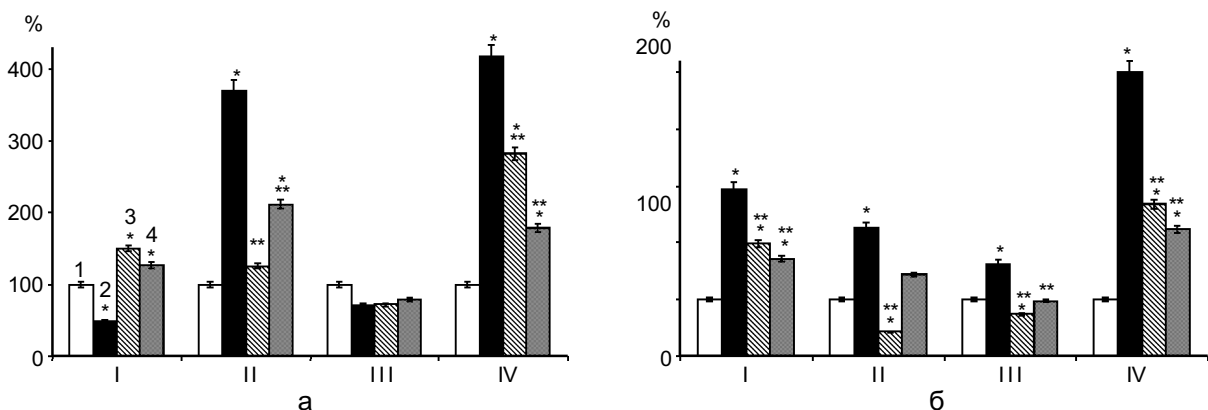


Рис. 4. Вплив еналаприлу на вміст сечовини (а) та сечової кислоти (б) в серці (I), аорті (II), плазмі (III) та еритроцитах (IV) старих щурів: 1 – контроль, 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення еналаптілу протягом одного місяця, 4 – протягом двох місяців

дійсно може розвиватися навіть за високих рівнів експресії eNOS – через втрату кофакторів, зниження рівнів субстратів. В цих умовах eNOS замість NO та цитруліну генерує супероксид і гідроксиаргінін [18].

Отже, ангіотензин II може одночасно як підвищувати експресію eNOS через взаємодію з рецептором ангіотензину II чи завдяки підвищенню вмісту H_2O_2 , так і здійснювати інгібування її активності за допомогою взаємодії з рецептором ангіотензину I через підвищення активності протеїнкінази C, яка інгібує eNOS через її фосфорилування. Ще одним механізмом інгібуючої дії ангіотензину II на активність eNOS може бути пригнічення аденілатциклазної сигнальної системи, оскільки цАМФ активує eNOS через той же кальцій-незалежний механізм фосфорилування eNOS по серину 1177 протеїнкіназою [32], подібно до інших відомих активаторів – інсуліну, цераміду, естрогену, кальційтріолу (активний метаболіт вітаміну D3) тощо. При старінні підвищується як вміст ангіотензину, так і активність протеїнкінази C [11], а відтак це може бути однією з причин зниження рівнів фосфорилування eNOS по серину 1177 і, як наслідок, низької активності eNOS у серцево-судинній системі старих щурів, попри високий рівень її експресії.

У такому разі, біохімічними механізмами кардіо- і вазопротекторної дії еналаприлу, що інгібує утворення ангіотензину II, може бути зменшення гіперекспресії eNOS, але насамперед підвищення її активності внаслідок відміни інгібуючої дії ПКК на активність eNOS, та активація eNOS за рахунок цАМФ-залежного фосфорилування (зняття інгібування аденілатциклазної системи). Крім того, завдяки зниженню експресії (а, отже, і активності) iNOS обмеженням генерації $\cdot O_2^-$, і зниженню активності нітратредуктази за дії еналаприлу, може відмінитися блокуюча дія високого вмісту неконститутивно синтезо-

ваного NO на активність eNOS.

Показано, що високі рівні сечової кислоти (гіперурикемія) з одного боку стимулюють синтез ангіотензину II, а з другого – інгібують активність eNOS [22]. Обидва механізми можуть спричиняти ендотеліальну дисфункцію та гіпертензію у старих щурів [4,23]. В свою чергу, ангіотензин II, через стимуляцію активності iNOS і, особливо, ксантиноксидази, продуктами якої є сечова кислота та $\cdot O_2^-$, також викликає порушення функції ендотелію [24]. Еналаприл внаслідок зниження рівнів ангіотензину II в наших дослідках часозалежно нормалізував біохімічний профіль (активність окисного de novo та відновного реутилізаційного синтезу NO, пули його стабільних метаболітів, активність аргінази і, особливо, вміст сечовини та сечової кислоти) в серці, аорті та крові старих щурів, наслідком чого було відновлення ендотеліальної функції.

Нині з'явилася інформація про те, що функціонально активним "релаксуючим" пулом в аорті є лише оксид азоту, синтезований eNOS, а не iNOS, оскільки відсутня кореляція між вмістом NO, синтезованого iNOS і вмістом цГМФ [30]. В такому разі, негативна дія ангіотензину II полягає у збільшенні синтезу функціонально неактив-

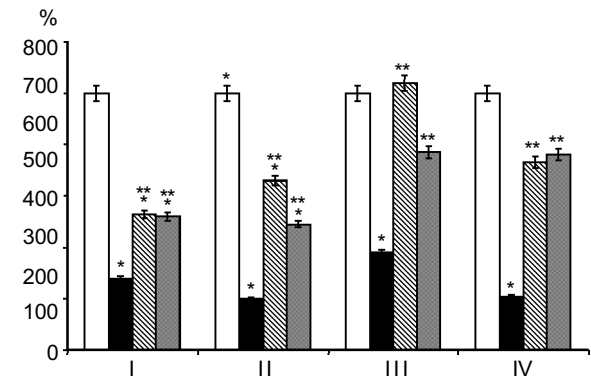


Рис. 5. Вплив еналаприлу на зміни індексу оксигенації в серці (I), аорті (II), плазмі (III) та еритроцитах (IV) старих щурів: 1 – контроль, 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення еналаприлу протягом одного місяця, 4 – протягом двох місяців

ного (“нерелаксуючого”) NO ферментами iNOS і, можливо, нітратредуктазою у кардіо-васкулярній системі. Позитивний вплив еналаприлу на ендотелійзалежне розслаблення в аорті, на наш погляд, проявляється в обмеженні синтезу цього пулу, за допомогою інгібування активності iNOS і редуктази, що, в свою чергу, сприяє підвищенню активності eNOS та синтезу функціонально-активного “релаксуючого” пулу NO.

ВИСНОВКИ

1. З віком у щурів ушкоджуються насамперед залежні від ендотелію реакції розслаблення ГМ судин. Проте здатність до розслаблення не втрачається. Ця вікова дисфункція ендотелію є реальним фактором ризику розвитку вазоспастичних реакцій. Тривале, протягом 30 діб, вживання еналаприлу призводить до нормалізації амплітуди ендотелійзалежних реакцій розслаблення ГМ грудної аорти старих щурів на ацетилхолін. Подовження терміну дії препарату до 55 діб майже не потенціює виявлений ефект.

2. Введення еналаприлу протягом 30 діб інгібує активність iNOS у серці, аорті та активує eNOS у старих тварин, що призводить до нормалізації NO-синтезувальної активності eNOS і тим самим відновлює ендотеліальну функцію. Еналаприл знижує в цих тканинах активність відновного шляху синтезу NO, інгібуючи активність нітратредуктази. Зниження генерації NO нітратредуктазним шляхом та за дії iNOS має за наслідок активацію eNOS за рахунок відміни автоінгібування високими рівнями NO. При цьому в досліджених тканинах знижуються рівні пулів нітрат-аніона і навпаки, підвищуються пули нітрит-аніона, що свідчить про зростання доступності кисню та зниження напруги оксидативного стресу.

3. Введення еналаприлу призводило також до зниження вмісту сечової кислоти в досліджуваних тканинах, що свідчить про

його виражену антиоксидантну дію. Отже, еналаприл може бути досить ефективним антиоксидантом, а також засобом корекції дисфункції NO і ендотелійзалежних механізмів регуляції тонусу судин, що виникають з віком.

**V.F.Sagach, O.V.Baziljuk, L.G. Stepanenko,
Ju.P.Korkach, A.V.Kotsuruba**

ACE INHIBITOR ENALAPRIL ACTION ON NITRIC OXIDE SYNTHESIS, OXIDATIVE METABOLISM AND VASCULAR TONE OF AGING RAT

Endothelium-dependent and endothelium-independent reactions of relaxations of vascular smooth muscle (VSM) were examined in the aorta preparations of the two groups (6-8 and 21-22 month). The studies also two NO synthase (NOS) isoform activity - inducible (iNOS) and constitutive (cNOS), activity of arginase and nitrate reductase and the content of high-molecular nitrosothiols (HMNT) and low-molecular nitrosothiols (LMNT) and stable metabolites of NO (NO_2^- , NO_3^-). Aging rats demonstrated only endothelium-dependent responses of VSM to acetylcholine lowering. This endothelial dysfunction depend on high activity of arginase, iNOS and salvage (by nitrate reductase) NO synthesis, both reactive oxygen species (ROS) (by xanthine oxidase) and peroxynitrite generation, as well as low activity of constitutive (eNOS, nNOS) NO synthesis. Angiotensin-converting enzyme inhibitor (enalapril) administration (20 mg/kg, 30 or 55 days) up regulate constitutive NO synthesis by arginase, iNOS, nitrate reductase activity and ROS and peroxynitrite generation inhibition thus restore endothelium-dependent relaxations of VSM in aging rats. The result obtained suggest a new roles for the renin-angiotensin system in vascular tone regulation. Thus enalapril might serve as a novel tool to prevent aging-associated endothelial dysfunction.

O.O.Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;

O.V.Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аликулов З.А., Львов Н.П. Кретович В.Л. Нитрат- и нитрит- редуктазная активности молока // Биохимия. – 1980. – 45, №9. – С. 1714–1718.
2. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Олешко Н.Н. та ін. Система оксиду азоту за умов хронічного дефіциту

- перебрального дофаміну // *Фізіол. журн.* – 1999. – **45**, №1–2. – С.16–25.
3. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюруба А.В., Буханевич О.М. Порухення ендотелійзалежних судинних реакцій, аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії // *Там само.* – 2000. – **46**, №3. – С.3–13.
 4. Сагач В.Ф., Коцюруба А.В., Базілюк О.В. та ін. Інгібітори аргіназного шляху метаболізму L-аргініну як новий клас антигіпертензивних сполук: дія карбаміду на окисний метаболізм ліпідів і судинний тонус при артеріальній гіпертензії // *Там само.* – 2001. – **47**, №5. – С.3–11.
 5. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Коцюруба А.В., Базілюк О.В. та ін. Ендотелійзалежні скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у щурів за умов старіння // *Там само.* – 2002. – **48**, №4. – С.3–13.
 6. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Коцюруба А.В., Базілюк О.В. та ін. Вікові особливості змін скорочувальних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження // *Там само.* – 2005. – **51**, №3. – С.32–41.
 7. Фролькис В.В., Базілюк О.В., Сыкало Н.В. Роль эндотелия в возрастных изменениях реактивности сосудов к действию физиологически активных веществ и гипоксии // *Проблемы старения и долголетия.* – 1993. – **3**, №2. – С.83–90.
 8. Шугалей В.С., Козина А.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // *Физиол. журн. СССР.* – 1977, № 8. – С. 1199–1202.
 9. Aoyagi K., Nagase S., Tomida C. et al. Synthesis of guanidinosuccinate from argininosuccinate and reactive oxygen in vitro // *Enzyme Protein.* – 1996. – **49**(4). – P.199–204.
 10. Aoyagi K. Inhibition of arginine synthesis by urea: a mechanism for arginine deficiency in renal failure which leads to increased hydroxyl radical generation // *Mol. and Cell. Biochem.* – 2003. – **244**(1–2). – P.11–15.
 11. Boesch D.M., Garvin J.L. Age-dependent activation of PKC isoforms by angiotensin II in the proximal nephron // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2001. – **281**(3). – R861–867.
 12. Boyde J.R., Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacyc monoxime // *Anal. Biochem.* – 1980. – **107**. – P.424–431.
 13. Cai H., Li Z., Dicalov S. et al. NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277** (50). – P.48311–48317.
 14. Cernadas M.R., Sanchez de Miguel L., Garcia-Duran M. et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats // *Circulat. Res.* – 1998. – **83**(3). – P.279–286.
 15. Childers-Peterson T., Brajter-Toth A. A HPLC assay of the electro-oxidation of purines uric acid and the nucleotide drug // *Anal. Chem. Acta.* – 1987. – **202**, №1. – P.167–174.
 16. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. et al. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**, № 5. – P. 797–804.
 17. Gerdel D., Cederbaum A.J. Inhibition of the catalytic activity of alcoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc // *Biochemistry.* – 1996. – **35**, № 50. – P.16186–16194.
 18. Giraldez R.R., Panda A., Zweier J.L. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? // *Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol.* – 2001. – **16**, № (1). – H. 2–5.
 19. Gonzales Bosc L.V., Kurnjek M.L., Muller A. et al. Effect of chronic angiotensin II inhibition on the nitric oxide synthase in normal rat during aging // *Hypertension.* – 2001. – **19** (8). – P.1403–1409.
 20. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**, № 1. – P.131–138.
 21. Jszakahara H. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – **270**, №5. – E840–E845.
 22. Mazzali M., Filho G.A. Use of aminophylline and enalapril in posttransplant polycythemia // *Transplantation.* – 1998. – **65**(11). – P.1461–1464.
 23. Mazzali M., Hughes J., Kim Y.G. et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystalindependent mechanism // *Hypertension.* – 2001. – **38** (5). – P.1101–1106.
 24. Mervaala E.M., Cheng Z.J., Tikkanen I. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes // *Ibid.* – **37**(2 Part 2). – P.414–418.
 25. Olson S., Oeckler R., Li X. et al. Angiotensin II stimulates nitric oxide production in pulmonary artery endothelium via type 2 receptor // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2004. – **287** (3). – L. 559–568.
 26. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthase // *FEBS Lett.* – 1991. – **291**, № 1. – P. 145–149.
 27. 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 // *J. Hypertension.* – 1993. – **11**. – P.623–627.
 28. Xu W.M., Liu L.Z., Charles I.S. Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice // *FASEB J.* – 2001. – **15**. – P.131–148.
 29. Watanabe T., Barker T.A., Berk B.C. Angiotensin II

- and Endothelium: Diverse Signals and Effects // Hypertension. – 2005. – **45** (2). – P.163–169.
30. Wu L, de Champlain J. Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats // Ibid. – 1999. – **34**(6). – Н. 1247–1253.
31. Zhang Z., Naughton D., Winyard P.G. Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1998. – **249**, №3. – P. 767–772.
32. Zhang X.P., Hintze T.H., Boesch D.M., Garvin J.L. cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2006. – **290**(6). – H.2376–2384.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України;
Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 06.03.2007*