

**ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН АРГІНАЗО-NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ
У ПАЦІЄНТІВ З ІШЕМІЧНОЮ ХВОРОБОЮ СЕРЦЯ**

Досліджено зміни ензиматичних активностей аргінази та сумарної NO-синтази у пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС) різних вікових груп. Установлено, що порушення функціонального стану ендотелію у хворих на ІХС характеризується зростанням активності сумарної NO-синтази, що призводить до гіперсинтезу "шкідливого" NO. Підвищення активності аргінази більш виражене у пацієнтів з ІХС похилого віку та є компенсаторним механізмом в обмеженні біодоступності L-аргініну. Припускається, що дисфункція аргіназо-NO-синтазної системи відіграє важливу роль у механізмах порушення NO-регуляторних властивостей та NO-гомеостазу ендотелію судин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ішемічна хвороба серця, оксид азоту, NO-синтаза, аргіназа.

ВСТУП. Значна поширеність різних клінічних форм ішемічної хвороби серця (ІХС), високий ризик розвитку тяжких ускладнень та передчасної смерті визначають вагоме медико-соціальне значення цієї патології. Згідно із сучасними уявленнями, серед патогенетичних механізмів ініціації та прогресування ІХС провідна роль належить ендотеліальній дисфункції, яку пов'язують із порушенням синтезу й активності оксиду азоту (NO) [5, 9].

У фізіологічних умовах NO забезпечує регуляцію судинного тону, проліферацію гладком'язових клітин та цілий ряд системних ефектів у просвіті судин. Зниження біодоступності NO для ендотеліоцитів зумовлює порушення ендотелієзалежної вазодилатації та відіграє важливу роль у прогресуванні багатьох серцево-судинних захворювань, зокрема ІХС [2].

У фізіологічних умовах ензиматичне утворення NO в організмі людини та тварин з амінокислоти L-аргініну відбувається під дією Р-450-подібних гемопротеїнів – NO-синтаз (NOS, EC 1.14.13.39.) [11]. Синтез NO регулюється також аргіназою (EC 3.5.3.1.), яка конкурує з NOS за спільний субстрат – L-аргінін, перетворюючи його на L-орнітин та сечовину.

Співвідношення між NO-синтазним (окисним) та аргіназним (неокисним) шляхами метаболізму L-аргініну підтримує у клітинах фізіологічний пул цієї амінокислоти і визначає інтен-

сивність продукування NO та його метаболітів [1]. За різних патологічних станів організму це співвідношення змінюється, що може бути зумовлено зміною біодоступності L-аргініну, розвитком оксидативного стресу чи гіпоксичного стану, що характерно для ІХС.

Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених дослідженню NO за розвитку ІХС, недостатньо вивченими залишаються механізми підтримання NO-гомеостазу з участю аргіназо-NO-синтазної системи, а також їх вікові зміни.

Метою роботи було дослідити інтенсивність обміну L-аргініну за двома альтернативними (неокисним аргіназним і окисним NO-синтазним) шляхами його метаболізму в плазмі крові пацієнтів з ІХС різних вікових груп.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Проведено обстеження 50 пацієнтів із ІХС (32 чоловіків та 18 жінок) віком 45–75 років. Середній вік хворих становив $(56,8 \pm 1,7)$ року. Діагноз ІХС верифікували на основі скарг і анамнезу хвороби, а також на основі інструментальних даних (ЕКГ (включаючи добовий моніторинг ЕКГ), ехокардіографічне дослідження, велоергометрія).

Відповідно до завдань дослідження, пацієнтів з ІХС поділили на дві вікові групи: група А – пацієнти середнього віку (45–60 років), група Б – пацієнти похилого віку (61–75 років) (ВООЗ, 1963). За статтю, тривалістю захворювання, кількістю нападів болю чи відчуття стискання за грудниною групи хворих були

зіставними. У дослідження включено пацієнтів з ІХС, які не отримували курсового лікування нітропрепаратами, проте епізодично використовували нітрогліцерин для зняття нападів стенокардії. Групи контролю (порівняння) становили практично здорові донори без клінічних ознак серцево-судинної патології, репрезентативні за віком і статтю, яких також поділили на аналогічні дві вікові групи.

Активність ензимів окисного та неокисного шляхів метаболізму L-аргініну досліджували в цільній крові. Інтенсивність обміну L-аргініну в процесі окисного метаболізму оцінювали за рівнем активності сумарної NOS, активність якої тестували за кількістю нітрит-аніона, що утворюється у процесі реакції. Середовище інкубації для визначення сумарної NOS-активності містило: 0,1 М трис-НCl (pH=7,4), 5 мМ MgCl₂, 1,0 мМ NADPH ("Sigma", США), 1 мМ L-аргінін та 10 мМ CaCl₂. Реакцію ініціювали шляхом додавання 0,2 мл крові до інкубаційної суміші (кінцевий об'єм – 2,0 мл). Проби протягом 20 хв витримували на водяній бані при температурі 37 °С та постійному струшуванні. Ензиматичну реакцію зупиняли введенням до розчину 1,25 мл 85 мМ NaOH та 1,25 мл 75 мМ ZnSO₄. Контрольні зразки готували аналогічно, але до середовища не вносили субстрат. Після зупинки ензиматичної реакції проби центрифугували (15 хв, 3000 g). В аліквоті супернатанту визначали рівень NO₂⁻ з використанням реактиву Гриса [13]. Активність сумарної NOS виражали в нмолях NO₂⁻/хв на 1 мл крові.

Інтенсивність неокисного метаболізму оцінювали за аргіназою активністю. Активність аргінази тестували за утворенням сечовини, вміст якої вимірювали за допомогою діагностичного набору фірми "Сімко" (Україна) відповідно до інструкції фірми-виробника [8]. Аліквоти лізатів інкубували 30 хв на шейкері при 37 °С у суміші такого складу (в М): трис – 2, MnCl₂ – 0,2; NaOH – 10, аргінін – 1. Реакцію зупиняли шляхом внесення до розчину 36 мкл 50 % трихлороцтової кислоти, після чого в ньому визначали загальний вміст сечовини. Крім дослідних, готували аналогічні до них зразки, в яких реакцію припиняли до інкубації, що дозволяло визначити вихідний вміст сечовини. До контрольної проби замість супернатанту вводили бідистильовану воду. Готували також пробу, яка містила стандартний розчин сечовини (16,65 ммоль/л) замість супернатанту. Всі зразки спектрофотометрували проти контрольних при 520 нм. Активність аргінази виражали в мікромолях утвореної сечовини/хв на 1 л крові.

Результати досліджень обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Розбіжності вважали статистично вірогідними, якщо p≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті проведених досліджень встановлено, що у практично здорових осіб активність сумарної NOS з віком дещо зростає, проте ці зміни не є статистично вірогідними (рис.). Так, сумарна

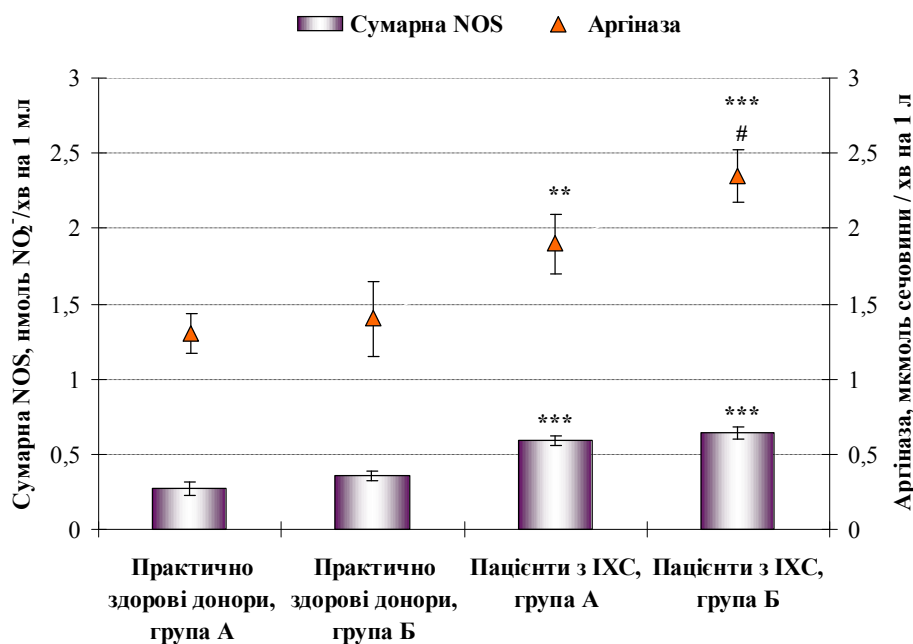


Рис. Активність сумарної NO-синтази (NOS) та аргінази в пацієнтів з ІХС різних вікових груп (***) – p<0,001; ** – p<0,01 вірогідно порівняно з показниками групи контролю; # – p<0,05 вірогідно стосовно показника в пацієнтів групи А).

NOS у практично здорових осіб середнього віку становить $(0,27 \pm 0,05)$ нмоль $\text{NO}_2^-/\text{хв}$ на 1 мл крові, а в осіб групи похилого віку – $(0,36 \pm 0,05)$ нмоль $\text{NO}_2^-/\text{хв}$ на 1 мл крові.

У пацієнтів з ІХС середнього віку активність сумарної NOS статистично вірогідно зростає у 2,2 раза стосовно здорових донорів цієї вікової групи і становить $(0,59 \pm 0,03)$ нмоль $\text{NO}_2^-/\text{хв}$ на 1 мл крові. У хворих похилого віку вона статистично вірогідно підвищується в 1,8 раза стосовно здорових донорів похилого віку і складає $(0,64 \pm 0,04)$ нмоль $\text{NO}_2^-/\text{хв}$ на 1 мл крові.

Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, які також показали збільшення активності NOS у пацієнтів з ІХС [12]. Підвищення активності сумарної NOS свідчить про гіперпродукцію NO і може бути зумовлене зростанням експресії індукцибельної ізоформи NOS (iNOS), яка постійно надекспресується на рівні транскрипції та забезпечує утворення додаткової кількості NO в клітині за умов розвитку різних патологічних станів організму. Показано, що активація iNOS призводить до синтезу NO в кількості, яка значно перевищує його синтез з участю eNOS [16].

Гіперпродукція NO з участю iNOS може бути компенсаторним механізмом, направленим на покращення перфузії тканин. З іншого боку, надлишок NO є більш небезпечним, ніж його нестача. Висока концентрація “шкідливого” NO активує в організмі процеси оксидативного та нітрозивного стресу, які призводять до порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. У результаті цього відбуваються активація апоптичних механізмів та ініціація деструктивних процесів у кардіоміоцитах, ендотеліоцитах та інших клітинах, що викликає прогресування дисфункції серцево-судинної системи [10].

Оскільки L-аргінін є субстратом не лише для NOS, а й для аргінази, то було важливо дослідити інтенсивність неокисного шляху метаболізму цієї амінокислоти при ІХС. Аргіназа та NOS використовують спільний субстрат – L-аргінін, і в разі його дефіциту між ними можливе виникнення конкурентних взаємозв'язків. Аргіназа відіграє роль лімітуючого фактора в утворенні NO. Знижуючи концентрацію L-аргініну, аргіназа інгібує NOS, безпосередньо регулюючи синтез NO [14, 15].

Як показали отримані нами результати, активність аргінази в практично здорових донорів середнього і похилого віку становить

$(1,3 \pm 0,1)$ та $(1,4 \pm 0,2)$ мкмоль сечовини/хв на 1 л крові відповідно. У пацієнтів з ІХС інтенсивність неокисного аргіназного шляху обміну L-аргініну зростає, на що вказує активація аргінази (в 1,5 раза у пацієнтів середнього віку та в 1,7 раза в пацієнтів похилого віку порівняно з групами практично здорових донорів). Так, активність аргінази у хворих на ІХС середнього віку становить $(1,9 \pm 0,2)$ мкмоль сечовини/хв на 1 л крові, а в пацієнтів похилого віку – $(2,35 \pm 0,17)$ мкмоль сечовини/хв на 1 л крові. Активність аргінази у пацієнтів з ІХС похилого віку достовірно відрізняється від цієї величини у хворих середнього віку.

Відомості стосовно змін активності аргінази з віком є суперечливими. Так, продемонстровано активацію неокисного метаболізму L-аргініну з віком у мітохондріях серця щурів [6]. Водночас показано зниження активності аргінази у старих тварин (на 42 %) порівняно з дорослими [3]. Отримані нами результати стосовно змін активності аргінази у пацієнтів з ІХС узгоджуються з даними, одержаними іншими дослідниками. Вони показали, що активність аргінази в еритроцитах хворих на ІХС була достовірно вищою порівняно з такою у здорових осіб [4].

Активація неокисного аргіназного шляху обміну L-аргініну вірогідно має компенсаторне значення, яке полягає в обмеженні доступності аргініну як субстрату для синтезу “шкідливого” NO за умов патології.

Отримані нами результати дозволяють припустити, що зміна функціонального стану аргіназо-NO-синтазної системи за умов розвитку ішемічної хвороби серця є визначальним механізмом, який зумовлює порушення NO-регуляторних властивостей та NO-гомеостазу і проявляється дисфункцією ендотелію судин.

ВИСНОВКИ. Встановлено порушення функціонального стану аргіназо-NO-синтазної системи у пацієнтів з ІХС, яке полягає в активації NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну. Показано, що зростання активності аргінази є більш вираженим для хворих на ІХС похилого віку, ніж середнього. Водночас вікової залежності підвищення активності сумарної NO-синтази у пацієнтів з ІХС не відмічають.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні активності ендотеліальної та індукцибельної ізоформ NO-синтази у пацієнтів з ІХС різних вікових груп.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барська М. Л. Дослідження окремих ланок окисного та неокисного шляхів обміну L-аргініну в лейкоцитах при цукровому діабеті 1-го типу / М. Л. Барська, І. В. Бродяк, Н. О. Сибірна // Мед. хімія. – 2006. – **8**, № 3. – С. 67–69.
2. Березин А. Е. Донаторы NO в лечении пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями: перспективы клинического применения производных сидномина / А. Е. Березин // Укр. мед. часопис. – 2010. – 4 (78). – С. 49–53.
3. Вікові особливості стану системи оксиду азоту в судинній стінці / О. В. Ніжанковська, Р. І. Потапенко, С. М. Новікова [та ін.] // Біологіческие механизмы старения : VII Международный симпозиум : тез. докл. – Харьков, 2006.
4. Коваленко В. Н. Рівні циркулюючих метаболітів окисного та неокисного обміну L-аргініну залежно від рівня холестерину у пацієнтів з ішемічною хворобою серця та есенціальною гіпертензією / В. Н. Коваленко, Т. М. Корнієнко, Т. В. Семікопна // Укр. кардіол. журн. – 2003. – **5**. – С. 14.
5. Коноплева Л. Ф. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и методы ее коррекции / Л. Ф. Коноплева // Therapia. – 2011. – **3** (56). – С. 26–30.
6. Коцюруба А. В. Вікові особливості змін аргіназо-NO-синтазної системи в серці щурів в умовах адаптації до тривалих фізичних навантажень плавання / А. В. Коцюруба, Ю. П. Коркач, С. О. Таланов // Фізіол. журн. – 2012. – **58**, № 1. – С. 27–35.
7. Оксид азоту, вік, стрес / О. К. Кульчицький, Р. І. Потапенко, С. М. Новікова [та ін.] // Проблеми старіння і довголіття : V Національний конгрес геронтологів і геріатрів України : тези доп. – 2010. – **19**, № 3. – С. 236.
8. Перетятко Ю. В. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення / Ю. В. Перетятко, Н. О. Сибірна // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 2. – С. 40–48.
9. Роль дисфункції ендотелія в генезі серцево-сосудистих захворювань / В. Н. Ельський, Н. Т. Ватулін, Н. В. Калінкіна [и др.] // Журн. АМН України. – 2008. – **14**, № 1. – С. 51–62.
10. Роль корекції метаболізму оксиду азоту в організмі при профілактиці гіпертонічного ремоделювання серцево-сосудистої системи / В. І. Бувальцев, С. Ю. Машина, Д. А. Покидьшев [и др.] // Рос. кардіол. журн. – 2002. – **5** (37). – С. 74–81.
11. Сибірна Н. О. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах / Н. О. Сибірна, М. Я. Люта, Н. І. Климишин // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2010. – **4**, № 1. – С. 143–160.
12. Телятников О. В. Особливості вторинної профілактики ішемічної хвороби серця у робітників транспорту / О. В. Телятников // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2010. – **4** (22). – С. 65–68.
13. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, D. F. Wagner, J. Glogowski [et al.] // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
14. Durante W. A critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function / W. Durante, F. K. Johnson, R. A. Johnson // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – **34**, № 9. – P. 906–1911.
15. New insights into arginase. Part II. Role in physiology and pathology / M. Mielczarek-Putka, A. Chrzanowska, W. Grabon [et al.] // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2008. – **62**. – P. 214–221.
16. Role of NO and superoxide in acute cardiac allograft rejection in rats / E. Akizuki, T. Akaike, S. Okamoto [et al.] // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 2000. – **225** (2). – P. 151–159.

А. С. Беседина

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ АРГИНАЗО-NO-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА**Резюме**

Исследованы изменения ферментативных активностей аргиназы и суммарной NO-синтазы у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) различных возрастных групп. Установлено, что нарушение функционального состояния эндотелия у больных с ИБС характеризуется ростом активности суммарной NO-синтазы, что ведет к гиперсинтезу “вредного” NO. Повышение активности аргиназы более выражено у пациентов с ИБС пожилого возраста и является компенсаторным механизмом в ограничении

биодоступности L-аргинина. Предполагается, что дисфункция аргиназо-NO-синтазной системы играет важную роль в механизмах нарушения NO-регуляторных свойств и NO-гомеостаза эндотелия сосудов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ишемическая болезнь сердца, оксид азота, NO-синтаза, аргиназа.

A. S. Besedina

DANYLO HALYTSKYI LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

AGE-RELATED PECULIARITIES OF ARGINASE-NO-SYNTHASE SYSTEM IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Summary

The alterations of arginase and total NO-synthase enzyme activities in patients with ischemic heart disease (IHD) in different age groups have been studied. It has been found that disturbance of endothelial function in patients with IHD is characterized by increased activity of total NO-synthase, which leads to hypersynthesis of "harmful" NO. Increase in arginase activity is more expressed in elderly patients with IHD and is the compensatory mechanism to limit the L-arginine bioavailability. It is assumed that dysfunction of arginase-NO-synthase system plays an important role in the mechanisms of disturbance of NO regulatory properties and NO homeostasis of vascular endothelial.

KEY WORDS: **ischemic heart disease, nitric oxide, NO-synthase, arginase.**

Отримано 01.04.13

Адреса для листування: А. С. Беседіна, вул. Івасюка 4, кв. 8, Львів, 79006, Україна, e-mail: annabes@ukr.net.