

В.Ф. Сагач, А.В. Коцюрuba, О.В. Базілюк, О.Ф. Мегедь, Л.Г Степаненко

## **Інгібітори аргіназного шляху метаболізму L-аргініну як новий клас антигіпертензивних сполук: дія карбаміду на окисний та неокисний метаболізм L-аргініну і тонус судин при артеріальній гіпертензії**

*Изучили действие хронического введения ингибитора аргиназного пути метаболизма L-аргинина – карбамида (40 мг/кг в течение 14 и 28 сут) на неокислительный (активность аргиназы и содержание эндогенного карбамида и полиаминов, образующихся в сопряженной с аргиназой орнитиндекарбоксилазной реакцией с использованием продукта аргиназной реакции L-орнитина) и окислительный (активность суммарной NO-синтазы и содержание стабильных метаболитов оксида азота – нитрит- и нитрат-анионов) метаболизм L-аргинина в аорте, сердце, плазме и эритроцитах крови крыс со спонтанной гипертензией. Показано, что экзогенный карбамид является ингибитором не только аргиназной, но и орнитиндекарбоксилазной реакции, ограничивая потребление эндогенного L-аргинина для синтеза карбамида и полиаминов в исследованных тканях сердечно-сосудистой системы. Ограничение утилизации аргинина по пути неокислительного его метаболизма способствует усилению продукции оксида азота при окислительном метаболизме L-аргинина по NO-синтазному пути, однако не устраняет имеющую место при наследственной хронической гипертензии ишемизацию тканей сердечно-сосудистой системы. После длительного введения карбамида, несмотря на некоторое снижение системного артериального давления, у крыс со спонтанной гипертензией, не наблюдалось нормализации эндотелийзависимых реакций расслабления гладких мышц аорты на ацетилхолин, что свидетельствует о сохранении некоторой дисфункции эндотелия.*

### **ВСТУП**

Продукт білкового обміну – карбамід (сечовина) міститься в крові теплокровних тварин у концентрації в середньому 0,5 ммоль/л, у плазмі людини – 3,8–5,8 ммоль/л. При деяких захворюваннях його концентрація може збільшуватися, наприклад, при уремії навіть до 10 ммоль/л. Ефект карбаміду залежить від концентрації.

Виявилося, що в помірних концентраціях (0,17–0,33 ммоль/л) карбамід відновлює попередньо заблоковану  $\text{CdCl}_2$  скорочувальну реакцію актоміозину на АТФ [4]. У концентраціях, близьких до фізіологічних,

він може зменшувати інотропний вплив на серце при подразненні симпатичного нерва [7]. Розчин Рінгера, що містить карбамід у концентрації 3–3,5 ммоль/л, помітно покращує роботу ізольованого серця жаби [1]. Внутрішньовенне введення високих доз карбаміду викликає (за електроенцефалограмою) виражені зміни діяльності кори головного мозку котів [16]. При набряках мозку внутрішньовенне введення гіпертонічного розчину карбаміду призводить до помітного зниження внутрішньочерепного тиску, тому часто карбамід використовується в неврологічній практиці. Такий позитивний його вплив не можна пояснити

© В.Ф. Сагач, А.В. Коцюрuba, О.В. Базілюк, О.Ф. Мегедь, Л.Г Степаненко

лише осмотичними явищами, оскільки гіпертонічні розчини, наприклад, глюкози чи сахарози виявляються в цьому відношенні малоефективними [5]. При експериментальній уремії (концентрація карбаміду  $23,5 \text{ ммоль/л} \pm 6 \text{ ммоль/л}$  порівняно з  $6,8 \text{ ммоль/л} \pm 0,1 \text{ ммоль/л}$  у нормі) більше ніж удвічі збільшується тонічне напруження ізольованої стегнової артерії, помітно зменшується діаметр судин легенів, проте систолічний артеріальний тиск не змінюється [15]. За іншими даними карбамід дозозалежно (20, 50, 100 ммоль/л) пригнічує вазоконстрикторний ефект фенілефрину (на 17, 25, 30% відповідно), збільшує позаклітинну концентрацію  $K^+$ , але не змінює базальний рівень напруження гладеньких м'язів артерій [19]. Це вказує на те що, карбамід часто чинить певний активуючий вплив на різні фізіологічні процеси. Протилежні дані було отримано при дослідженні його дії на ферменти. В концентраціях, що не денатурують білок, карбамід (в дослідах *in vitro* та *in vivo*) знижує активність деяких ферментів, в тому числі аргінази [15], моноаміноксидази, сукцинатдегідрогенази, холінестерази [6]. В останньому випадку у собак з експериментальною уремією холінестеразна активність серцевого м'яза знижується за допомогою карбаміду в 1,5 рази. Показано також, що при уремії зменшується транспорт L-аргініну в ендотеліальних клітинах і активність ендотеліальної NO-синтази. Автори вважають це реальним внеском у розвиток гіпертензії [20].

Отже, карбамід, як виявилось, досить активна сполука. Тому вивчення механізмів його впливу на фізіологічні і біохімічні процеси має як теоретичне, так і практичне значення. Метою нашої роботи було дослідити дію екзогенного карбаміду на інтенсивність окисного (NO-синтазного) та неокисного (аргіназного) шляхів обміну L-аргініну і скорочувальні реакції гладеньких м'язів аорти у щурів зі спадковою артеріальною гіпертензією (із спонтанною гіпер-

тензією). Раніше нами було показано [8], що при гіпертензії активується неокисний шлях метаболізму L-аргініну, тому використання інгібітора аргінази, яким є карбамід, на нашу думку, мало би нормалізувати порушені у цих щурів судинні реакції.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на щурах лінії Вістар з нормальним артеріальним тиском і лінії Кіото зі спонтанною гіпертензією до і після використання карбаміду. Останній вводили внутрішньочеревинно у водному розчині в дозі 40 мг/кг щодобово протягом 14 і 28 діб.

У гомогенатах аорти та серця, а також у плазмі та еритроцитах крові визначали біохімічні показники, що характеризують інтенсивність двох шляхів ферментативного метаболізму L-аргініну. Інтенсивність неокисного метаболізму L-аргініну оцінювали, визначаючи активність ферменту аргінази та вміст продукту аргіназної реакції карбаміду і продукту орнітиндекарбоксилазної реакції поліамінів. Інтенсивність окисного метаболізму L-аргініну оцінювали, визначаючи сумарну активність NO-синтаз (NOS) і вміст стабільних метаболітів оксиду азоту (NO), що при цьому утворюються – нітрит- та нітрат-аніонів ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Оцінювали також співвідношення інтенсивності цих шляхів, визначаючи співвідношення активності їх ключових ферментів аргінази / NOS, а також продуктів цих реакцій (карбамід + поліаміни) / ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ).

Активність аргінази визначали за продуктом реакції карбаміду [14]. Інкубаційна суміш містила 10 ммоль/л L-аргініну в 5 ммоль/л бікарбонатному буфері pH 9,5. Вміст карбаміду оцінювали за реакцією з диметилмонооксимом [2]. Вміст сумарних поліамінів визначали за концентрацією путресцину (орнітиндекарбоксилазна реакція) [10]. Усі ці три показники визначали за допомогою спектрофотометричного методу.

Визначення активності сумарної NOS у пробах проводили колориметричним методом [17]. Інкубаційна суміш (1 мл) складалася з 350 ммоль/л  $\text{HEPES}$  (рН 7,4), 1,5 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$ , 1 ммоль/л  $\text{НАДФН}$ , 80 мкмоль/л  $\text{FAD}$ , 20 мкмоль/л тетрагідробіоптерину ( $\text{BH}_4$ ), 13 мкг кальмодуліну, 1 ммоль/л  $\text{L}$ -аргініну, 60 ммоль/л  $\text{L}$ -валіну, 100 од. супероксиддисмутази. Реакцію запускали, додаючи 0,1 мл проби, що містила близько 500 мкг загального білка. Інкубацію проводили при  $37^\circ\text{C}$  протягом 60 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл  $2\text{ N HClO}_4$ . Суміш центрифугували при 10000 г протягом 10 хв. Вміст  $\text{NO}_2^-$  визначали в безбілкових аліквотах проб після визначення активності NOS або в безбілкових розчинах гомогенатів тканин клітин у колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна в нашій модифікації [3]. Вміст  $\text{NO}_3^-$  визначали в гомогенатах тканин спектрофотометричним методом [11] у нашій модифікації, де замість запропонованого авторами стрихніну ми використовуємо його гідроксильоване похідне – бруцин, що дозволило значно підвищити чутливість методу.

Вміст загального білка в пробах визначали загальноновживаним методом Бредфорда [12].

Доступність кисню для проходження киснезалежних процесів, у тому числі для синтезу  $\text{NO}$  при окисненні  $\text{L}$ -аргініну, оцінювали за відношенням  $\text{NO}_2^- \cdot 10^3 / (\text{карбамід} + \text{NO}_3^-)$ .

На ізольованих препаратах грудної аорти щурів зі спонтанною гіпертензією, в режимі, що наближався до ізометричного, реєстрували скорочувальну активність гладеньких м'язів (ГМ). Для цього судини нарізали на сегменти завширшки 2–2,5 мм і масою 2–4 мг за орієнтацією їх м'язового шару (під кутом приблизно  $45^\circ$ ). Кільцевий препарат переносили в проточну, термостатовану ( $35^\circ\text{C}$ ) камеру, поміщали в стандартний буферний розчин Кребса (рН 7,4) і

піддавали пасивному розтягненню з силою 7–15 мН. За таких умов препарат витримували 30–60 хв. Скорочувальну активність ГМ реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX 1С. Вимірювали амплітуду (у відсотках) і латентний період (у секундах) змін тонічного напруження ГМ на вазодилаторні агоністи – ацетилхолін йодид ( $\text{АХ}$ ,  $10^{-6}$  моль/л) і нітропрусид натрію ( $\text{НП}$ ,  $10^{-4}$  моль/л) (“Sigma”, США). Попередньо ГМ активували додаванням до буферного розчину норадреналіну ( $\text{НА}$ ) в концентрації  $10^{-6}$  моль/л. Від рівня сталого скорочення ГМ на  $\text{НА}$  (“плато”), що приймався за 100 %, проводили розрахунки змін амплітуди реакцій ГМ на вазодилатори.

Результати оброблено статистично з використанням критерію  $t$  Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Донедавно було відомо, що в багатьох типах клітин відбувається неокисний метаболізм  $\text{L}$ -аргініну, який включає аргіназну реакцію ( $\text{L}$ -аргінін  $\rightarrow$  карбамід і орнітин) і спряжену з нею орнітиндекарбоксілазну реакцію (орнітин  $\rightarrow$  путресцин  $\rightarrow$  поліаміни). З відкриттям окисного метаболізму  $\text{L}$ -аргініну за участю  $\text{NO}$ -синтаз ( $\text{L}$ -аргінін  $\rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ) стало ясно, що між цими двома шляхами метаболізму існує конкуренція за спільний субстрат.

У таблиці наведено показники, які характеризують інтенсивність неокисного (активність аргінази, вміст карбаміду та поліамінів) та окисного (активність NOS, вміст стабільних метаболітів  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) метаболізму  $\text{L}$ -аргініну в аорті, серці, плазмі та еритроцитах крові щурів з нормальним рівнем системного артеріального тиску. Значення цих показників при хронічній гіпертензії (ХГ) до і після введення карбаміду виражено у відсотках до таких значень при нормотензії, які прийнято за 100 %. Ці результати представлено на рис. 1, 2.

**Показники неокисного та окисного метаболізму L-аргініну у щурів з нормальним артеріальним тиском (M ± m; n=10)**

Тканина	Неокисний метаболізм			Окисний метаболізм		
	Активність аргінази, нмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка	Вміст карбаміду, нмоль · мг <sup>-1</sup> білка	Вміст поліамінів, нмоль · мг <sup>-1</sup> білка	Активність NO-синтази, пмоль · хв. <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка	Вміст NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , пмоль · мг <sup>-1</sup> білка	Вміст NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , нмоль · мг <sup>-1</sup> білка
Аорта	1,12±0,07	43,00±5,60	184,20±11,50	410,30±65,40	2150,00±180,00	170,00±20,16
Серце	1,08±0,10	36,85±5,32	45,41±6,45	68,24±9,95	795,00±144,00	63,73±7,92
Плазма	1,27±0,19	50,18±5,38	13,47±2,46	25,18±2,60	313,70±41,50	35,50±6,68
Еритроцити	0,19±0,02	1,54±0,36	1,42±0,19	3,18±0,27	28,29±4,94	2,84±0,45

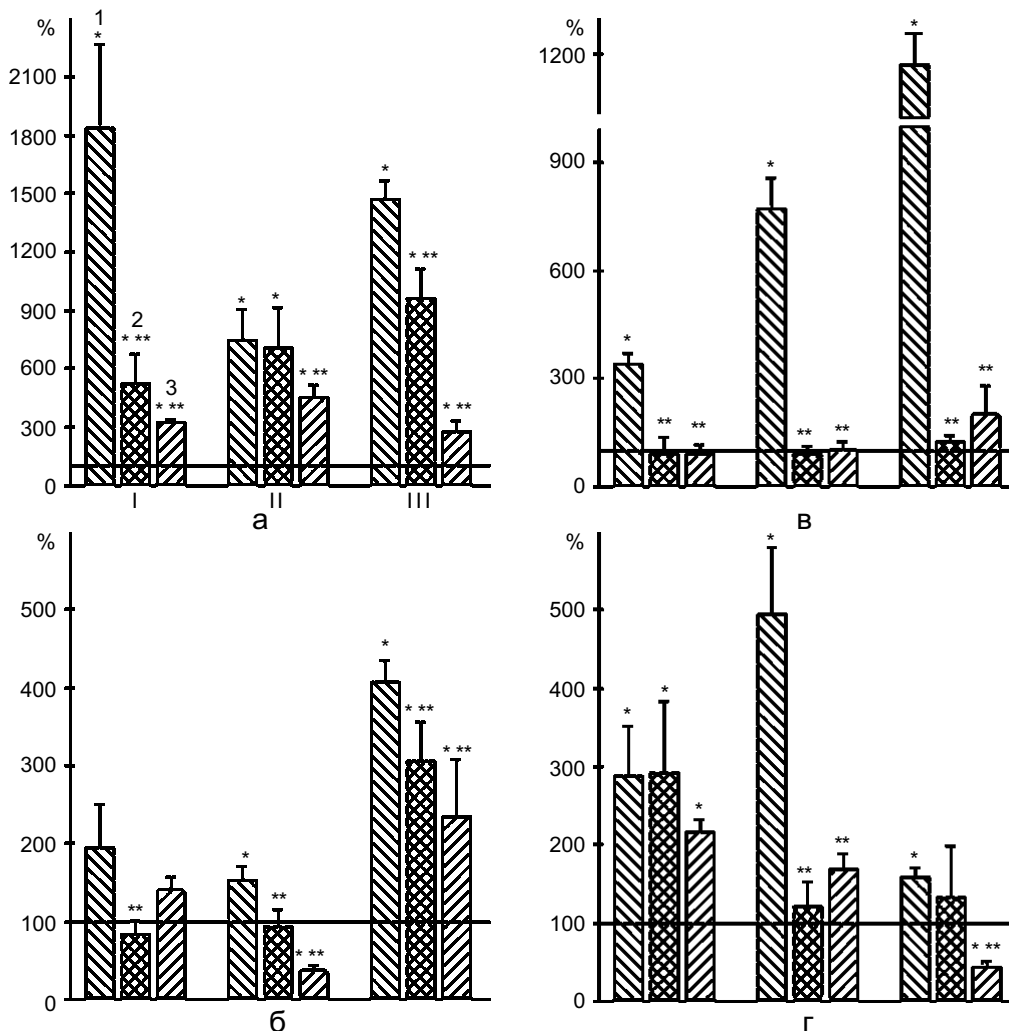


Рис. 1. Дія екзогенного карбаміду на неокисний метаболізм L-аргініну при спадковій хронічній артеріальній гіпертензії: а – аорта; б – серце; в – еритроцити; г – плазма крові; I – активність аргінази; II – вміст ендogenous карбаміду; III – вміст поліамінів: 1 – хронічна гіпертензія та, 2, 3 – хронічна гіпертензія та введення карбаміду протягом 14 і 28 діб відповідно.

\* різниця достовірна відносно контролю (нормотензія);

\*\* різниця достовірна відносно значень за умов хронічної гіпертензії

Нами встановлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією достовірно підвищувався неокисний метаболізм L-аргініну. Це проявлялося в значному збільшенні активності аргінази і зростанні ендогенних пулів карбаміду та поліамінів (див. рис. 1). Введення таким щурам екзогенного карбаміду значно зменшило інтенсивність неокисного обміну L-аргініну у всіх досліджених тканинах. Найбільший інгібуєчий ефект карбаміду виявлено в аорті, де актив-

ність аргінази знижувалась із  $1833 \pm 423$  до  $524 \pm 139$  та  $329 \pm 11$  % через 14 і 28 днів відповідно. Суттєвим було також зменшення активності аргінази в еритроцитах, менше в серці, а в плазмі крові це не спостерігалось. (див. рис. 1).

Незважаючи на такі значні зміни активності аргінази вміст ендогенного карбаміду в аорті щурів з гіпертензією після введення екзогенного карбаміду практично не змінювався на 14-ту добу і дещо зни-

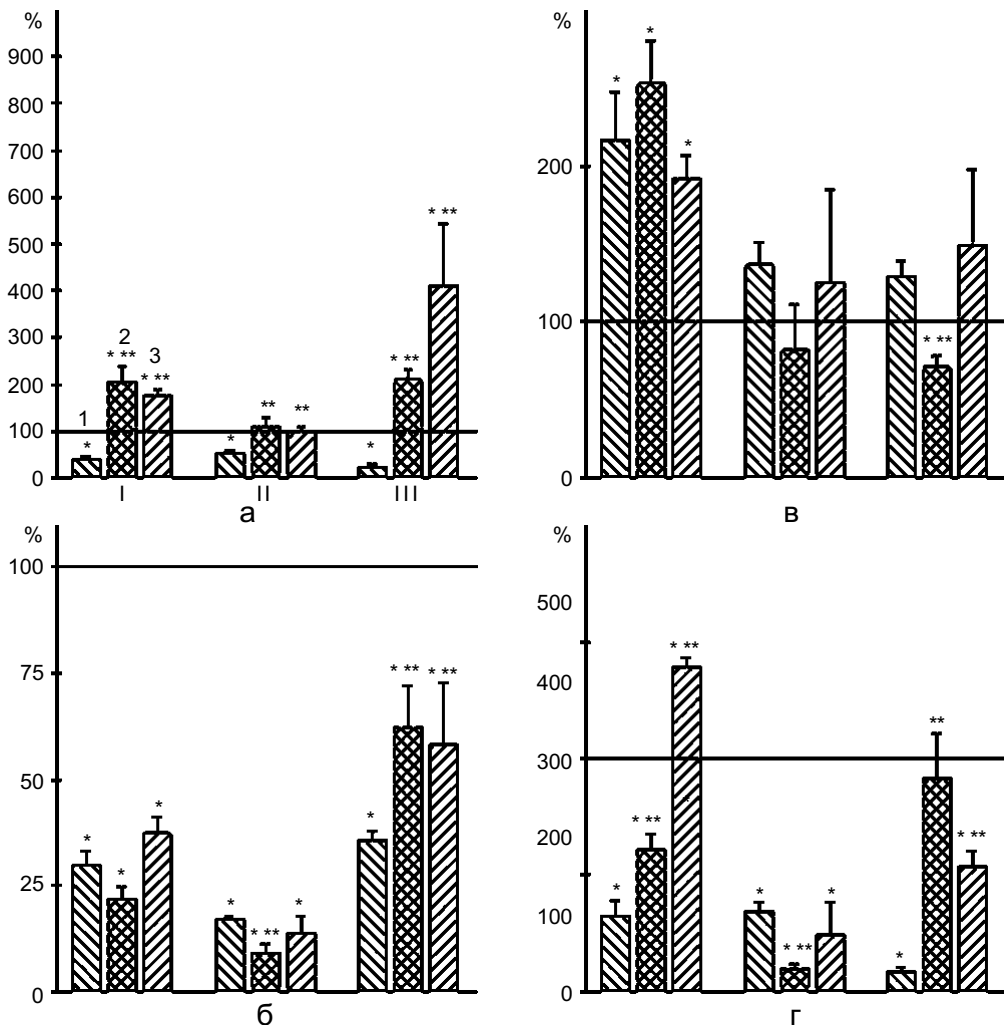


Рис.2. Дія екзогенного карбаміду на окисний метаболізм L-аргініну при спадковій хронічній артеріальній гіпертензії: а – аорта; б – серце; в – еритроцити; г – плазма крові; I – активність NO-синтази; II – вміст  $\text{NO}_2^-$ ; III – вміст  $\text{NO}_3^-$ ; 1 – хронічна гіпертензія та, 2, 3 – хронічна гіпертензія та введення карбаміду протягом 14 і 28 днів відповідно.

\* різниця достовірна відносно контролю (нормотензія);

\*\* різниця достовірна відносно значень за умов хронічної гіпертензії

жувався на 28-ту добу. Водночас в еритроцитах, серці та плазмі крові достовірно знижувався вміст ендogenous карбаміду у всі досліджені терміни (див. рис. 1).

Вміст поліамінів (значно підвищений при гіпертензії) після введення екзогенного карбаміду зменшувався у всіх досліджуваних тканинах. Найбільш значним це було в еритроцитах при гіпертензії ( $1554\% \pm 502\%$ , через 14 та 28 діб  $126 \pm 15$  та  $204\% \pm 74\%$  відповідно) після введення карбаміду (див. рис. 1). Відомо, що поліаміни деякою мірою можуть заміщати NO по мінімізації внутрішньоклітинного кальцію і тим самим чинити вазодилататорний вплив [16, 18]. У зв'язку з цим не виключено, що збільшення вмісту поліамінів при гіпертензії є компенсаторною реакцією у відповідь на обмеження синтезу оксиду азоту. Якщо це так, тоді обидва шляхи обміну L-аргініну – як окисний, так і неокисний спрямовані на генерацію вазодилататорних сполук. Отже, антигіпертензивна стратегія досліджень повинна враховувати встановлений баланс між вказаними вище шляхами. Тому використання не надто “потужного” інгібітора аргінази карбаміду (про що свідчать наші результати) є цілковито виправданим. Слід зауважити також, що карбамід є інгібітором не лише аргіназної, але й орнітиндекарбоксілазної реакції. Підтвердженням цього є значне зменшення вмісту поліамінів у всіх досліджуваних тканинах щурів зі спонтанною гіпертензією при дії карбаміду. Це абсолютно передбачуваний наслідок, враховуючи подібність активних центрів ферментів.

Нами встановлено, що при хронічній гіпертензії відбувається значне зниження сумарної активності NOS в аорті, серці та плазмі крові. Тільки в еритроцитах вона, навпаки, була вищою більше ніж удвічі порівняно з нормотензією. На рис. 2 показано вплив екзогенного карбаміду на окисний метаболізм L-аргініну. Вже на 14-ту добу після введення карбаміду активність

NOS у плазмі крові збільшувалася, а на 28-ту добу навіть була вищою від норми ( $32,47 \pm 6,08$ ,  $61,01 \pm 5,96$  та  $139,18\% \pm 3,62\%$  відповідно). В аорті ці зміни також сягали значень, що перевищували такі при нормотензії. Проте в серці за цих умов підвищення активності NOS не відбувалося. В еритроцитах активність NOS практично залишалася незмінною. Отже, отримані результати (див. рис. 2) свідчать про те, що тривале введення екзогенного карбаміду призводить до нормалізації активності окисного метаболізму L-аргініну в аорті і плазмі крові щурів з гіпертензією.

Вміст стабільних метаболітів NO, що синтезуються при дії NOS за цих умов, повністю нормалізувався в аорті, тоді як в інших досліджуваних тканинах практично не змінювався (див. рис. 2). Більше того, в плазмі крові та серці вміст  $\text{NO}_2^-$  на 14-ту добу введення карбаміду навіть транзитно зменшувався, а на 28-му добу вертався майже до значень, що зареєстровані контролем. Водночас зміни вмісту  $\text{NO}_3^-$ , який є найбільш стабільною циркулюючою формою NO і виводиться із системи циркуляції (екскреція з сечею) після впливу карбаміду відрізнялися. Так, в аорті щурів з гіпертензією вміст його перевищував контрольний рівень в 2 рази на 14-ту добу і в 4 рази на 28-ту добу після введення карбаміду. Достовірно збільшувався вміст  $\text{NO}_3^-$  також у серці та плазмі крові. Можливо, відсутність зростання пулів  $\text{NO}_2^-$  у серці та плазмі крові при введенні екзогенного карбаміду зумовлені саме «перетіканням» NO в найбільш окиснену форму –  $\text{NO}_3^-$ . В цілому ж сумарний вміст  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  при двох термінах введення карбаміду відносно до їхнього значення при хронічній гіпертензії збільшується (рис. 3).

Ми виявили також, що за умов хронічної гіпертензії активність аргіназного метаболізму L-аргініну переважає над NO-синтазним, а саме: в аорті в 48 разів; в плазмі майже в 9 разів; в серці більш ніж в 7 разів.

Після введення карбаміду співвідношення активності ферментів аргіназа/NOS знижується. Максимально позитивний результат розвивається на 28-му добу після введення карбаміду ( $154\% \pm 13\%$  щодо  $887\% \pm 109\%$  за умов гіпертензії). В інших тканинах цей показник також достовірно зменшувався від рівня гіпертензії, проте в аорті і серці він усе ж таки не сягав норми, тоді як в еритроцитах, навпаки, був навіть

нижчим за неї (див. рис. 3).

За умов впливу екзогенного карбаміду на 28-ту добу в аорті, плазмі та еритроцитах, за винятком серця, у щурів зі спонтанною гіпертензією повністю нормалізувалося співвідношення продуктів неокисного та окисного метаболізму L-аргініну – (карбамід+поліаміни)/(NO<sub>2</sub> і NO<sub>3</sub>) (див. рис.3). Ці результати не завжди збігалися зі змінами співвідношення актив-

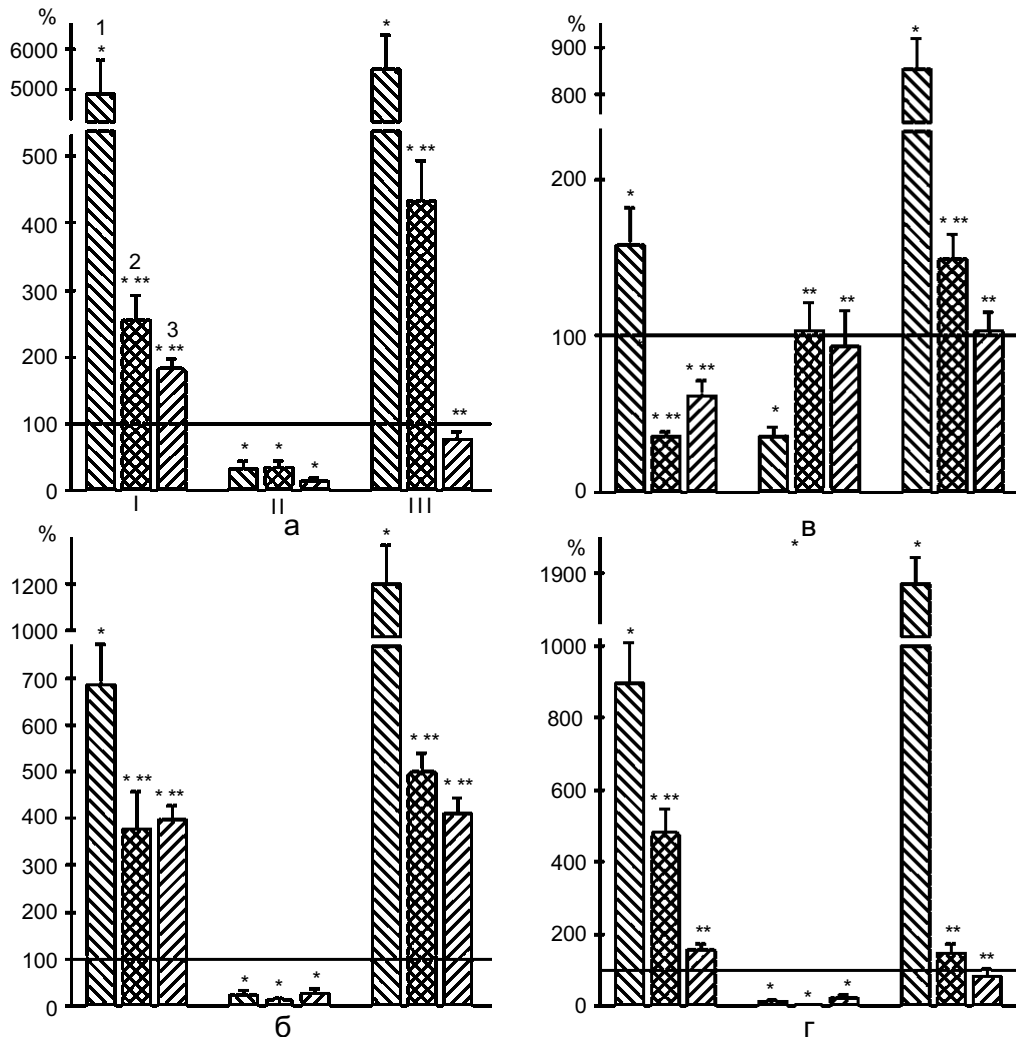


Рис.3. Дія екзогенного карбаміду на величини, що характеризують співвідношення неокисного та окисного метаболізму L- аргініну аргініну при спадковій хронічній артеріальній гіпертензії: а – аорта; б – серце; в – еритроцити; г – плазма крові; I – відношення (активність аргінази) / (активність NO-синтази); II – “індекс гіпоксії” (NO<sub>2</sub> · 10<sup>3</sup>)/(карбамід+NO<sub>3</sub>); III – відношення (кабамід+поліаміни)/(NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>): 1 – хронічна гіпертензія та, 2, 3 – хронічна гіпертензія та введення карбаміду протягом 14 і 28 діб відповідно.

\* різниця достовірна відносно контролю (нормотензія);

\*\* різниця достовірна відносно значень за умов хронічної гіпертензії

ності їх ферментів, що визначалися нами. Очевидно, для характеристики реального стану взаємовідносин цих двох шляхів метаболізму L-аргініну потрібні подальші дослідження.

Доступність  $O_2$  для проходження кисне-залежних процесів, у тому числі і для синтезу NO при окисненні L-аргініну, ми оцінювали за співвідношенням  $NO_2^- \cdot 10^3 / (\text{карбамід} + NO_3^-)$ . Виявилось, що у всіх досліджуваних тканинах щурів з гіпертензією порівняно зі значеннями щурів з нормальним артеріальним тиском, воно було значно нижчим. Тобто, нами отримано ще одне підтвердження факту ішемізації різних тканин серцево-судинної системи при хронічній гіпертензії. Після введення щурам з гіпертензією екзогенного карбаміду тільки в еритроцитах виявлено нормалізацію цього співвідношення, причому, майже повну. В аорті, серці та плазмі крові воно не зазнавало змін (див. рис. 3). Отже, інгібування аргіназного неокисного метаболізму L-аргініну, хоча і стимулювало утилізацію  $O_2$  для синтезу NO, але не поліпшувало кисневі потреби аорти, серця та плазми.

В цілому, проведені дослідження показали, що використання екзогенного карбаміду дозволяє обмежити утилізацію L-аргініну за неокисним шляхом, тим самим зберігаючи його для синтезу NO. Згідно з нашими результатами, дисбаланс між різними шляхами метаболізму L-аргініну у щурів з гіпертензією і дефіцит оксиду азоту, який виникає внаслідок цього, приводить до порушень NO-залежних реакцій ГМ судин на вазодилаторні сполуки, що реалізуються за участю ендотелію. Амплітуда розслаблення ГМ, наприклад, аорти на АХ ( $10^{-6}$  моль/л) зменшується більш ніж удвічі (з  $65 \pm 3,6$  до  $36,4 \pm 7,4$  %). Майже в 4 рази збільшується латентний період реакції, часто, замість розслаблення, з'являються реверсовані (констрикторні або констрикторно-дилаторні) реакції. Всі ці ушкодження скорочувальної активності, ймовірно

гладеньком'язових клітин можуть стати однією з причин підвищення тону судин. Разом з тим прямі вазодилаторні реакції на нітросполуки у цих тварин за амплітудою майже не змінюються (з  $80,4 \pm 0,2$  до  $82,6 \pm 2,9$  %). Тобто, при спадковій артеріальній гіпертензії ГМ судин не втрачають взагалі здатності до розслаблення, ушкоджується переважно ендотеліальний NO-залежний компонент регуляції тону судин [8].

Оскільки використання екзогенного карбаміду в наших дослідах підвищувало активність окисного шляху метаболізму L-аргініну і, відповідно, збільшувало вміст оксиду азоту в аорті щурів з гіпертензією, на разі було б сподіватися і на відновлення ушкоджених у них ендотеліозалежних судинних реакцій. Для з'ясування цього припущення на ізольованих препаратах грудної аорти щурів з гіпертензією, що протягом 28 діб щодобово отримували карбамід, реєстрували скорочувальні реакції ГМ на ендотеліозалежний (АХ) і ендотелійнезалежний (НП) агоністи. Попередньо ГМ були активовані додаванням до буферного розчину Кребса НА в концентрації  $10^{-6}$  моль/л. Дослідження показали, що за дії карбаміду ( $n=13$ ) розслаблення ГМ грудної аорти щурів з гіпертензією на АХ реєструвалася в 46 % експериментів (щодо 53 % у таких же тварин, але без впливу карбаміду). Амплітуда його коливалася від 20 до 30 %, в середньому, становила  $25,0 \pm 2,0$  %, тобто була навіть нижчою за таку без карбаміду. В інших 54 % експериментах у щурів з гіпертензією, що отримували карбамід, змін тонічного напруження ГМ аорти на АХ взагалі не відбувалося. На НП ГМ грудної аорти цих щурів ( $n=11$ ) за дії карбаміду, як і без нього, реагували тільки розслабленням (в 100% дослідів). Його амплітуда була в середньому  $80,6 \pm 6,2$  % тобто не відрізнялися від такої без карбаміду.

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що у щурів з гіпертензією, які три-



вальной час отримували карбамід, частота відтворення типових реакцій розслаблення ГМ аорти на ендотелійзалежний агоніст АХ та їх амплітуда не зазнавали позитивних змін. Амплітуда розслаблення ГМ аорти на ендотелійнезалежний агоніст НП практично не змінювалася. Отже, очікуваної нормалізації вазодилататорних реакцій, що залежать від ендотелію, після тривалого введення цим щурам карбаміду не відбувалося. Проте, як показали наші попередні дослідження, системний артеріальний тиск після такої «карбогенної терапії» у них знижувався на 20–25 мм рт. ст. [9]. Тобто, відновлення біохімічного гомеостазу і вмісту NO в аорті в тому числі, у таких тварин виявилися недостатніми факторами щодо реалізації NO- та ендотелійзалежних реакцій ГМ судин. Існують, певно, декілька конкуруючих за утилізацію NO чинників. Подібне підвищення активності NOS виявлено також у судинах старих тварин, але, на відміну від ситуації з карбамідом, тут виникав дефіцит NO, пов'язаний, як вважають, зі збільшенням вмісту пероксинітриду [18]. Для з'ясування цього, безперечно, потрібні подальші дослідження.

## ВИСНОВКИ

1. Спадкова хронічна артеріальна гіпертензія супроводжується інтенсифікацією неокисного (аргіназного) метаболізму L-аргініну з утворенням ендogenous карбаміду та поліамінів у спряженій з аргіназною орнітиндекарбоксилазною реакцією у всіх досліджених тканинах – аорті, серці, плазмі та еритроцитах крові.

2. Активність окисного метаболізму L-аргініну в NO-синтазній реакції з утворенням оксиду азоту при хронічній гіпертензії пригнічена в аорті, серці і плазмі крові, а в еритроцитах, навпаки, активована.

3. Введення екзогенного карбаміду, що є інгібітором аргінази, та, можливо, орнітиндекарбоксилази, змінює співвідношення

неокисного та окисного метаболізму L-аргініну на користь останнього, що призводить до нормалізації вмісту оксиду азоту в аорті щурів зі спонтанною гіпертензією.

4. Пригнічення аргіназного неокисного метаболізму L-аргініну і інтенсифікація NO синтазного шляху внаслідок збереження субстрату (L-аргініну) не усуває ішемізацію клітин серцево-судинної системи (серце, аорта), що спостерігається при спадковій хронічній артеріальній гіпертензії.

5. Незважаючи на суттєву активацію NO-синтазних реакцій після тривалого введення карбаміду, не відбувається нормалізації ушкоджених при хронічній артеріальній гіпертензії ендотелій- і NO-залежних вазодилататорних реакцій ГМ аорти, що свідчить про збереження деякої дисфункції її ендотелію.

**V.F. Sagach, A.V. Kotsuruba, O.V. Basilyuk, A.F. Meged, L.G. Stepanenko**

## **ARGINASE INHIBITORS AS A NEW CLASS OF ANTIHYPERTENSIVE DRUGS: ACTION OF UREA ON OXIDATIVE AND NONOXIDATIVE METABOLISM OF L-ARGININE AND VASCULAR TONE IN CHRONIC HYPERTENSION**

It has been studied an action of chronic urea introduction (40 mg/kg, 14 and 28 days) as arginase inhibitor on nonoxidative (arginase activity, urea, polyamines content) and oxidative (NOS activity, nitrite- and nitrate-anion content) metabolism of L-arginine in aorta, heart, plasma and erythrocytes of SHR. It has been shown that urea is an inhibitor of not arginase only, but also ornitinedecarboxylase (ODK) reactions, limiting L-arginine consumption for urea and polyamines synthesis and thus facilitating its utilization for nitric oxide synthesis by NOS. These exogenous effects of urea are not accompanied by amelioration of tissue ischaemization within cardiovascular system. It has been shown that exogenous urea down regulate blood pressure without any normalization of endothelium-dependent reactions of smooth muscle cells on acetylcholine in SHR.

*A. A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv*

*A. V. Palladin Institute of biochemistry National Academy of Science of Ukraine, Kyiv*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Довтян М.А. О роли орнитинового цикла и его компонентов // *Вопр. биохимии мозга.* – 1968. – №4. – С.237–266.
2. Колб В.Г., Калашникова В.С. Определение мочевины в сыворотке крови и моче по цветной реакции с диацетилмоноаксимом. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. – 311 с.
3. Коцюрuba А.В., Семикопна Т.В., Вікторов О.П. і ін. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині. – Патент України №31600А // *Бюл.* №7 – II від 15.12.2000 р.
4. Коштоянц Х.С. Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция. – М.: из-во АН СССР, 1951. – 238 с.
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. – 110 с.
6. Манухин Б.Н. Исследование механизма угнетающего действия мочевины на тиоловые ферменты на примере моноаминоксидазы // *Биохимия.* – 1958. – **23**, №2. – С.225–229.
7. Манухин Б.Н. Влияние мочевины на адреналиновый эффект сердца и сосудов // *Докл. АН СССР.* – 1959. – **127**, № 724. – С.58–65.
8. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюрuba А.В., Буханевич О.М. Порухення ендотелій-залежних судинних реакцій, аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії // *Фізіол. журн.* – 2000. – **46**, №3. – С.3–13.
9. Сагач В.Ф., Коцюрuba 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 // *Фізіол. журн.* – 2001. – **47**, №5. – С.3–11.
10. Сяткин С.П., Березов Т.Т. Спектрофотометрический метод определения орнитиндекарбоксилазы с поощью 2,4-динитрофторбензола // *Вопр. мед. химии.* – 1980. – 26, №4. – С.561–564.
11. Bank N.R., Aynedjian H.S. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration // *Kidney Int.* – 1993. – **43**. – P.1306–1312.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P.248–254.
13. Garganta C.L., Bond J.S. Assay of kinetics of arginase // *Ibid.* – 1982. – **126**, №1. – P.131–138.
14. Reczkovski R.S., Ash D.E. Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – **312**, №1. – P.31–37.
15. Savage T., McMahon A.C., Mullen A.M. et al. Increased myogenic tone precedes structural changes in mild experimental uremia in the absence of hypertension in rats // *Clin. Sci. (London).* – 1998. – **95**, №6. – P.681–686.
16. Stevenson G.C., Jacobs R.C., Ross M.W. et al. Effect of urea on central nervous system activity in the cat // *Am. J. Physiol.* – 1959, **197**. – №1. – P.141–144.
17. Yan L., Vandivier R.W., Suffredini A.F., Danner R.L. Human Polymorphonuclear leukocytes lack detectable nitric oxide synthase activity // *J. Immunol.* – 1994. – **153**. – P.1825–1834.
18. Van der Loo B., Labugger R., Skepper J.N. et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging // *J. Exp. Med.* – 2000. – **192**, №12. – P.1731–1744.
19. Wagner C.A., Huber S.M., Warntges S. et al. Effect of urea and osmotic cell shrinkage on Ca<sup>2+</sup> entry and contraction of vascular smooth muscle cells // *Pflug. Arch.* – 2000. – **440**, №2. – P.295–301.
20. Xiao L.A., Wagner L., Mahaney J. et al. Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2001. – **280**, №6. – F.989–995.

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

*Матеріал надійшов до редакції 01.10.2004*