

Фізичне тренування відновлює спряження конститутивних NO-синтаз та кардіогемодинаміку при гіпертензії (частина III)

Н.О.Дорофєєва, А.В. Коцюруба, Б.С.Коп'як, В.Ф.Сагач

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; E-mail: dorofeyva@mail.ru

У серці та його мітохондріях щурів зі спонтанною гіпертензією дослідили вплив періодичних фізичних навантажень (тренування плаванням помірної і надмірної інтенсивності) на фізіологічні показники кардіогемодинаміки і біохімічні показники, що характеризують рівень оксидативного та нітрозативного стресу. На основі останніх розраховували індекс спряження конститутивних кальційзалежних NO-синтаз (cNOS=eNOS + nNOS) і біохімічний індекс дисфункції. Установили, що за обох режимів тренування повністю відновлюється і навіть перевищує контрольні значення у нетренованих щурів лінії Вістар спряжений стан cNOS і кальційзалежний синтез оксиду азоту (NO). Виявили, що великі фізичні навантаження на межі функціональних можливостей тварин неефективні для покращення функціонального стану серцево-судинної системи при гіпертензії і можуть провокувати її подальший розвиток. Помірний режим фізичних тренувань поліпшував функцію розслаблення серця внаслідок збільшення максимальної швидкості зниження тиску, зменшення кінцевого діастолічного тиску і кінцево-діастолічної жорсткості міокарда. Помірні фізичні тренування знижували кінцево-систолический тиск і артеріальну жорсткість, що сприяло більш ефективній й енергоекономній роботі серця, про що свідчить зменшення ударної роботи при збільшенні ударного об'єму. Покращення фізіологічних показників кардіогемодинаміки і функціонального стану серця за помірного режиму тренувань корелювало зі змінами обох розрахованих індексів. Періодичні інтенсивні фізичні навантаження рекомендовано як простий фізіологічний засіб прекодиціювання для профілактики розвитку кардіальної дисфункції за гіпертонії внаслідок розвитку неспряженого стану cNOS та викликаної ним надмірної генерації супероксиду і навпаки, пригнічення кальційзалежного синтезу NO.

Ключові слова: спонтанна гіпертензія; фізичне тренування; неспряження cNOS; серце; мітохондрії серця; щури.

ВСТУП

Адаптація до фізичних навантажень (тренування) має різноманітний вплив на організм, підвищуючи функціональні можливості його систем, насамперед тих, що забезпечують киснетранспортні процеси. Тому фізичне тренування часто використовується з кардіопротекторною метою [1,2]. Дослідження останніх років показали, що основну роль у впливі тренування на серцево-судинну систему відіграє активація ендотелію [3-5] та ендотеліальної NO-синтази (eNOS) за допо-

могою збільшення фосфорилування залишку серину у положенні 1177 та зменшення фосфорилування залишку треоніну у положенні 495 [6,7]. Тому, можливо, позитивний вплив фізичних тренувань на серцево-судинну систему виявляється сильніше при патологічних процесах у цій системі, пов'язаних із пригніченням eNOS, а саме при гіпертензії, атеросклерозі, серцевій недостатності тощо [8,9]. Пригнічення продукції оксиду азоту (NO) при таких захворюваннях у похилому віці можуть бути пов'язані як із порушенням його синтезу de novo чи внаслідок реутилі-

© Н.О.Дорофєєва, А.В. Коцюруба, Б.С.Коп'як, В.Ф.Сагач

заційних процесів, так і з його інактивацією супероксидом (O_2^-) в умовах окисного стресу. Висловлюються гіпотези про залучення до цих процесів неспряження eNOS [10], яке також є результатом оксидативного та нітрозативного стресу, часто через її глутатіонування [11,12]. Таке неспряження cNOS (сумарних конститутивних NO-синтаз eNOS і/чи nNOS) раніше показано нами в серці і аорті при спонтанній гіпертензії.

Мета нашої роботи – з'ясування впливу фізичного тренування різної інтенсивності на реверсний процес спряження – неспряження cNOS, редокс-статус тканин серця та зміни кардіогемодинаміки у тварин при гіпертензії.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах-самцях віком 6 міс лінії Вістар та зі спонтанною гіпертензією. Всі експериментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986р. (86/609/ЕЕС). Фізичні навантаження забезпечувалися плаванням тварин при 32–34 °С. Режим фізичного навантаження був такий: тренування проводили 5 днів на тиждень упродовж 5 тиж. Були виділені 2 групи. Помірні тренування (ПТ)– фізичне навантаження починалося з 2 хв, тривалість збільшувалася кожен день на 1 хв і на 25-ту добу становила 20 хв і наступні 5 днів зберігалася незмінною. Для надмірного режиму тренувань (НТ) навантаження починалося з 2 хв, збільшувалося кожної доби на 2 хв і на 25 добу склала 40 хв і ще 10 днів не змінювалося. Слід зазначити, що 15,4% щурів зі спонтанною гіпертензією в режимі НТ загинули, під час виконання фізичних навантажень, 7,6% щурам проводили реанімаційні заходи, що може свідчити про те, що навантаження було на межі функціональних можливостей тварин. Показники контрольної групи (нетреновані щури лінії Вістар із нормальним артеріальним тиском і функцією серця), приймали за 100%. Після курсу фізичних тренувань щурів анестезували за допомогою

уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочеревинно). Функціональні показники кардіогемодинаміки у щурів *in vivo* реєстрували за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F. Катетер вводили через сонну артерію ретроградно у лівий шлуночок, що давало змогу одночасно реєструвати сигнали тиску й об'єму з візуалізацією кривих залежності цих показників протягом серцевого циклу [13]. Співвідношення тиску й об'єму лівого шлуночка визначали за допомогою програми PVAN 3,6 («Millar Instruments», США). Кінцево-діастолічну жорсткість (для оцінки здатності міокарда до розтягнення) визначали під час оклюзії черевної порожнистої вени в умовах зниженого притоку крові до серця. Артеріальну жорсткість розраховували як відношення значення кінцево-сistolічного тиску до ударного об'єму.

У мітохондріях серця та в надосадовій фракції після виділення мітохондрій методом центрифугування (яку ми позначали як гомогенат серця) визначали показники, які тестують наявність комбінованого окисного стресу (надлишкового синтезу O_2^- , NO і пероксинітриду). Показники оксидативного стресу (швидкість генерації супероксидного (O_2^-) і гідроксильного (OH) радикалів, пули стабільного пероксиду водню (H_2O_2), ейкозаноїдів тромбоксану B_2 (TxB_2) і пептидолейкотрієну C_4 (LTC_4), сечової кислоти та маркера перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) дієнових кон'югатів (ДК) визначали як описано [14]. Показники нітрозативного стресу – кальційзалежну активність cNOS, як суму ендотеліальної (eNOS) і нейрональної (nNOS) NO-синтаз, кальційнезалежну активність індукційної NO-синтази (iNOS), НАДН-залежну активність нітратредуктази, пули стабільних метаболітів NO – нітрит (NO_2^-)– і нітрат (NO_3^-)–аніонів, низькомолекулярних (НМНТ) і високомолекулярних (ВМНТ) нітрозотіолів, вміст регулятора активності cNOS сірководню (H_2S) виміряли як описано [15]. Умовне значення індексу спряження (coupling) cNOS розраховували як відношення активності cNOS до швидко-

сті генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в присутності її інгібітора L-NAME. Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін, O_2) і кофактора тетрагідробіоптерину (BH_4) для утворення NO, а не $\cdot\text{O}_2^-$ при окисному метаболізмі L-аргініну. Розраховували також умовний біохімічний індекс дисфункції (БІД) в серці і аорті як величину, що визначається за формулою: $\text{БІД} = (\text{вміст нітриту} / (\text{вміст нітрату} + \text{вміст нітриту})) \cdot (\text{індекс неспряження sNOS})$. Перший компонент формули відображає частку нітрит-аніона в сумі нітрит і нітрат, таким чином, відображає рівень оксигенації в органах серцево-судинної системи. Відомо, що NO_2^- спонтанно утворюється при окисненні NO лише в оксигенованих розчинах, в той час як NO_3^- лише в умовах інтегрального (як оксидативного, так і нітрозативного) окисного стресу при нерадикальному розпаді пероксинітриду. Другий компонент формули відображає рівень неспряження sNOS, який зростає в умовах оксидативного стресу. Отже, БІФ показує як ступінь оксидативного і нітрозативного стресу, так і вміст синтезованих sNOS пулів NO, необхідних для нормального функціонування серця й аорти. Загальний білок визначали методом Лоурі. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), Student (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1–3 показано зміни біохімічних показників у серці і його мітохондріях у нетренованих і тренуваних в ПТ- і НТ-режимах щурів зі спонтанною гіпертензією. Визначали вплив тренувань на показники оксидативного (рис. 1,а, 2,а) і нітрозативного (рис. 1,б, 2,б) стресу, які необхідні для встановлення джерел утворення супероксид-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) і оксиду азоту (NO), рівня спряження sNOS (за якого конститутивний кальційзалежний *de novo* синтез NO превалює над генерацією цими ферментами $\cdot\text{O}_2^-$). Ступінь розвитку оксидативного і нітрозативного стресу є

ключовою причиною неспряження sNOS (за якого генерація $\cdot\text{O}_2^-$ превалює над синтезом NO) і, тим самим, як показано нами в частині I цієї роботи за спонтанною гіпертензією, вважається нині важливою причиною розвитку кардіальної дисфункції.

Як видно з рис 1,а, рівень генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в мітохондріях серця усіх щурів зі спонтанною гіпертензією був стабільно високим. Дисмутація нестабільного радикала $\cdot\text{O}_2^-$ в стабільний H_2O_2 при цьому перевищувала контрольні значення майже вдвічі і знижувалася відносно вихідного рівня в 5 разів, а відносно контролю майже в 3 рази незалежно від режиму тренувань. Перетворення стабільного H_2O_2 в токсичний $\cdot\text{OH}$ -радикал, в мітохондріях щурів зі спонтанною гіпертензією було в 3 рази вищим порівняно з контролем, а після тренувань, залежно від їх режиму, знижувалося в 4,5–7 разів до значень удвічі нижчих від контрольних. Внаслідок зниження генерації $\cdot\text{OH}$ зменшувалася інтенсивність вільнорадикального ПОЛ до рівнів лише в 2 рази вищих від вихідного рівня. Про це свідчить значне (майже в 10 разів) зниження пулів ДК, які в мітохондріях тварин зі спонтанною гіпертензією були вищими від контролю. Причиною такої значної антиоксидантної дії фізичних навантажень у мітохондріях серця (див. рис. 1,а) не може бути зниження активності жодної із досліджених нами оксидаз – циклооксигенази, ліпоксигенази чи ксантиноксидази, про що свідчить відсутність змін у пулах маркерів цих генераторів $\cdot\text{O}_2^-$: TxV_2 , LTC_4 і сечової кислоти відповідно. Вірогідною причиною послаблення інтенсивності оксидативного стресу в мітохондріях може бути, як не дивно, зниження активності якоїсь із мітохондріальних супероксиддисмутаз, які перетворюють $\cdot\text{O}_2^-$ в H_2O_2 , і, навпаки, підвищення активності NO-залежного фермента каталази, що перетворює H_2O_2 в H_2O із виділенням O_2 . Цей процес може підвищувати оксигенацію мітохондрій, що підтверджується значними стабільними рівнями генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в дихальному ланцюзі мітохондрій у

тренуваних щурів (див. рис.1,а) і зниженням активності нітратредуктази (див. рис.1,б), активної виключно в гіпоксичних умовах.

Як видно з рис. 1,б, нітратредуктазна активність у мітохондріях щурів зі спонтанною гіпертензією більше ніж у 5 разів перевищувала контрольні значення, а після тренувань, незалежно від їх режиму, суттєво знижувалася, що вказує, з одного боку, на підвищення оксигенації мітохондрій, а з іншого – на значне зниження надлишкового реутилізаційного синтезу NO, що спостерігається в них за гіпоксичного стану, який виникає в умовах гіпертензії, тобто на пригнічення нітрозативного стресу. Послідовне відновлення нітрат-аніона до NO в мітохон-

дріях може здійснюватися «реверсним» (див. частину II) ферментом ксантинооксидазою або нітритредуктазною активністю eNOS, «вмонтованою» в комплекс I дихального ланцюга [16]. Два інші шляхи утворення надлишкового NO – внаслідок de novo синтезу кальційнезалежним ферментом iNOS і декомпозиції низькомолекулярних нітрозотіолів, що є донорами NO в мітохондріях серця, за дії тренувань, не зазнають змін. Водночас, конститутивний de novo синтез NO достовірно зростає за обох режимів тренувань (див. рис. 1,б) про що свідчить підвищення активності cNOS (eNOS і/чи nNOS). Наслідком підвищення оксигенації за тренування є також збільшення мітохондріальних пулів

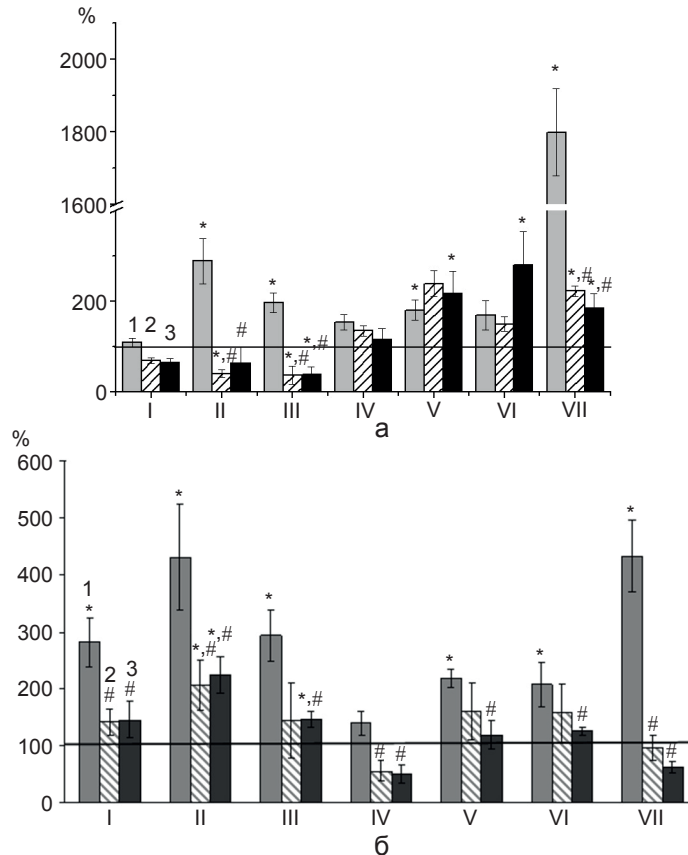


Рис 1. Відносні показники оксидативного (а) та нітрозативного (б) стресу в мітохондріях серця у щурів зі спонтанною гіпертензією (1), і тренуваних в помірному (2) і надмірному (3) режимах тренувань: на а: I – швидкість генерації $\cdot O_2^-$, II – швидкість генерації $\cdot OH$, III – вміст H_2O_2 , IV – тромбоксану B2, V – пептидолейкотрієну C4, VI – сечової кислоти, VII – дієнових кон'югатів. На б: I – активність конститутивних NO-синтаз, II – активність індукційної NO-синтази, III – нітратредуктазна активність, IV – вміст NO_2^- , V – NO_3^- , VI – низькомолекулярних нітрозотіолів, VII – високомолекулярних нітрозотіолів, VIII – H_2S , * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно контролю, # $P < 0,05$ відносно значень у щурів зі спонтанною гіпертензією

нітрит-аніона (NO_2^-), яке сильно залежало від режиму тренування. Значне (майже в 4 рази) зростання пулів нітрат-аніона (NO_3^-) в мітохондріях за більш тривалого режиму тренування, на наш погляд, зумовлюється підвищенням нерадикального розпаду пероксинітриду, альтернативного до його вільнорадикального розпаду на два токсичні радикали – $\cdot\text{OH}$ і $\cdot\text{NO}_2$ (див. рис.1,б). Слід відмітити також значне (у 5–8 разів залежно від режиму тренування) зниження пулів H_2S у мітохондріях тренуваних щурів зі спонтанною гіпертензією, причини якого нам невідомі. Зміни пулів H_2S у мітохондріях серця корелюють зі змінами індексів спряження cNOS та біохімічного індексу дисфункції. Таким чином, ці результати підтверджують

нашу гіпотезу (див. частину II) про велике значення підтримання мінімальних пулів H_2S для збереження L -цистеїну як субстрату синтезу глутатіону. При цьому роль відновленого глутатіону полягає в запобіганні глутатіонування окисненою формою глутатіону конститутивних NOS (eNOS і/чи nNOS), яке викликає їх неспряження.

На рис. 2 показано зміни показників оксидативного і нітрозативного стресу в гомогенатах серця. В серці тренуваних щурів зі спонтанною гіпертензією знижується швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ як ліпідними (циклооксигеназа і ліпоксигеназа), так і нуклеотидною (ксантиноксидаза) його генераторами (див. рис. 2,а), що може зумовлювати, як і в мітохондріях, але з інших причин, зниження пулів H_2O_2 та

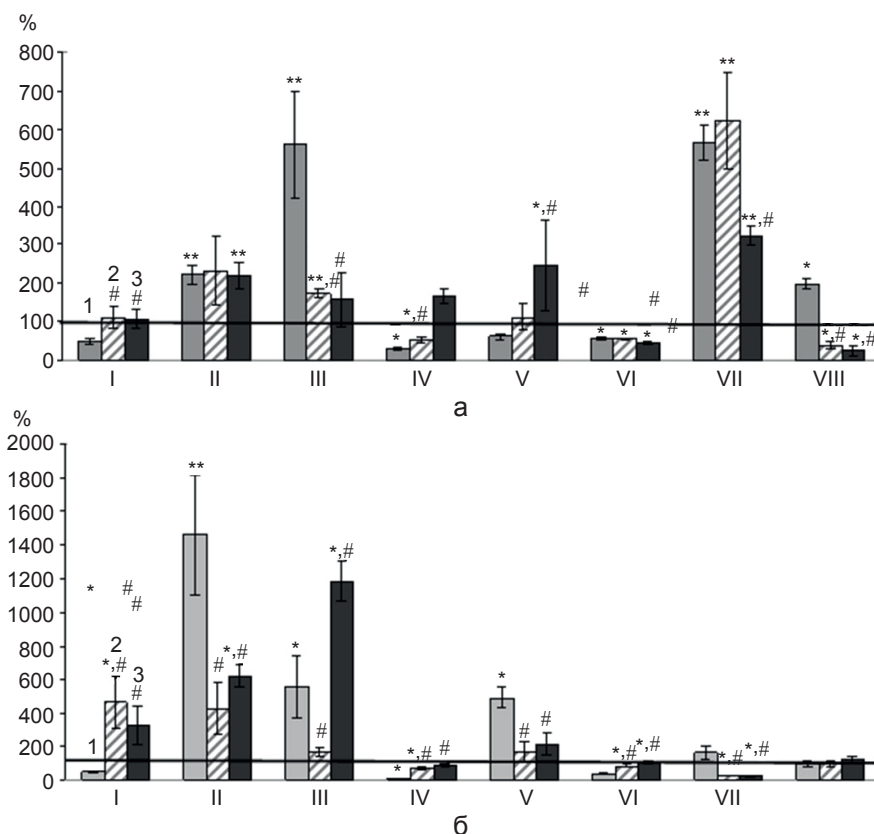


Рис 2. Відносні показники оксидативного (а) та нітрозативного(б) стресу в серці щурів зі спонтанною гіпертензією (1), тренуваних в помірному (2) і надмірному (3) режимах тренувань: на а: I – швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, II – швидкість генерації $\cdot\text{OH}$, III – вміст H_2O_2 , IV – тромбоксану B_2 , V – пептидолейкотрієну C_4 , VI – сечової кислоти, VII – дієнових кон'югатів. На б: I – активність конститутивних NO-синтаз, II – активність індукцибельної NO-синтази, III – нітратредуктазна активність, IV – вміст NO_2^- , V – NO_3^- , VI – низькомолекулярних нітрозотіолів, VII – високомолекулярних нітрозотіолів, VIII – H_2S , * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно контролю, # $P < 0,05$ відносно значень у щурів зі спонтанною гіпертензією

інгібування швидкості генерації $\cdot\text{OH}$ і викликаного ним вільнорадикального ПОЛ.

У тренуваних щурів зі спонтанною гіпертензією зростає конститутивний *de novo* синтез NO в серці та його мітохондріях (див. рис.1,б і 2,б) внаслідок відміни неспряженого стану cNOS, в якому вони знаходилися до початку тренувань (рис.3). Одночасно із цим внаслідок тренувань знижувався синтез надлишкового NO, який викликав нітрозативний стрес, утворюючи пероксинітрил. Так, за обох режимів тренування в серці (див. рис. 2,б), але не в його мітохондріях (див. рис.1,б), знижувалась активність iNOS – головного генератора надлишкового NO. Лише в серці також знижувалось і вивільнення NO із «депо» при декомпозиції низькомолекулярних нітрозотіолів, на що вказує підвищення їхніх пулів до контрольного рівня. Нітратредуктазна активність знижувалася до контрольного значення лише за помірному режиму тренування. Це вказує як на пригнічення реутилізаційного синтезу NO, так і на відновлення нормальної оксигенації серця лише за помірних, але не надмірних тренувань. Водночас за більш тривалого режиму тренування активність нітратредуктази в серці навпаки, підвищувалася, що вказує на можливе «перетренування», яке викликає гіпоксичний стан, який і призводить до активації фермента. Вагомим доказом зниження рівня нітроза-

тивного стресу (синтезу надлишкового NO і пероксинітрилу) за обох режимів тренування в серці щурів зі спонтанною гіпертензією може бути значне зниження пулів NO_3^- , який утворюється при розпаді пероксинітрилу і зниження здійснюваного ним нітрозилування по SH-групах цистеїну білків (доказом цього є зниження пулів VMHT) (див. рис.2,б). Особливо яскраво демонструє кардіопротекторну дію тренувань підвищення пулів NO_2^- в серці щурів зі спонтанною гіпертензією, можливе лише за умов нормальної оксигенації серця.

Підтверджується наше припущення про важливу роль нітрозоглутатіону (основна складова НМНТ) і H_2S у відновленні спряженого стану cNOS. Стабільність пулів H_2S в серці контрольних щурів і щурів зі спонтанною гіпертензією і при тренуванні в двох режимах (див. рис.2,б), згідно з нашою гіпотезою, є проявом реалізації ефекту «цистеїнового шунта» – адаптаційного кардіопротекторного використання L-цистеїну не для синтезу *de novo* H_2S , а для альтернативного синтезу відновленого глутатіону. Нітрозилування останнього з утворенням нітрозоглутатіону забезпечує «запобігання» глутатіонування по залишках цистеїну димерних молекул cNOS (eNOS або nNOS) окисненим глутатіоном, тим самим запобігаючи їх неспряженню.

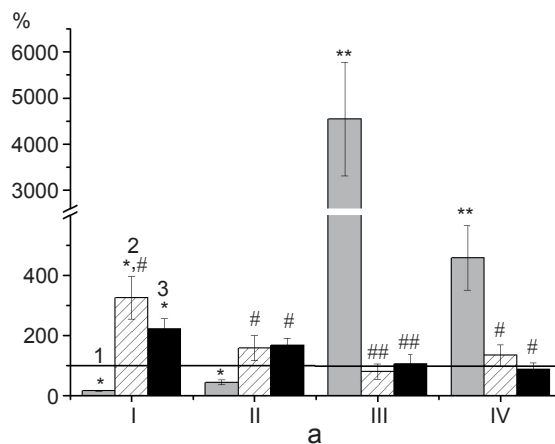


Рис.3. Відносні значення індексів спряження конститутивних NO-синтаз (IC) і біохімічний індекс функції (БІФ) в серці і в мітохондріях серця щурів зі спонтанною гіпертензією до (1) і після помірному (2) і надмірного (3) режиму тренувань: I - IC у серці, II - IC у мітохондріях серця, 3 - БІФ у серці, 4 - БІФ у мітохондріях серця, *P<0,05 відносно контролю, #P<0,05 відносно значень у щурів зі спонтанною гіпертензією

З рис.2,б і рис.3 видно, що підвищення активності кальційзалежних NOS у серці щурів зі спонтанною гіпертензією внаслідок фізичних навантажень корелює із підвищенням індексу спряження цих NO-синтаз. Як результат, індекс кардіальної дисфункції зменшувався, що підтверджується покращенням фізіологічних показників кардіогемодинаміки за помірному режиму тренувань (рис.4).

Нами виявлено, що різні режими фізичного навантаження мають різноспрямований вплив на показники кардіодинаміки у щурів зі спонтанною гіпертензією (див. рис. 4,а). Після помірному режиму тренувань кінцево-діастолічний тиск зменшився на 32,7 % і достовірно не відрізнявся від контролю, тоді як після посиленого режиму він збільшився в 1,5 раза ($P < 0,05$). Кінцево-систолічний тиск

після помірного режиму тренувань знизився на 23,8 % і достовірно не відрізнявся від контролю, а після посиленого режиму залишався на попередньому рівні.

Різнострамований вплив різних режимів тренувань ми спостерігали при аналізі показників функції розслаблення серця. Так, за помірного режиму тренувань збільшувалася максимальна швидкість зниження тиску, в той час як за посиленого режиму – знижувалась на 39 % ($P < 0,05$), що може вказувати на порушення функції розслаблення (див. рис. 4,б). Після курсу помірного режиму кінцево-діастолічна жорсткість міокарда знизилася в 8,3 раза, тоді як за посиленого – лише в 2 рази. Після помірного режиму тренувань спостерігалось зменшення в 2,8 раза артеріальної жорсткості, що свідчить про

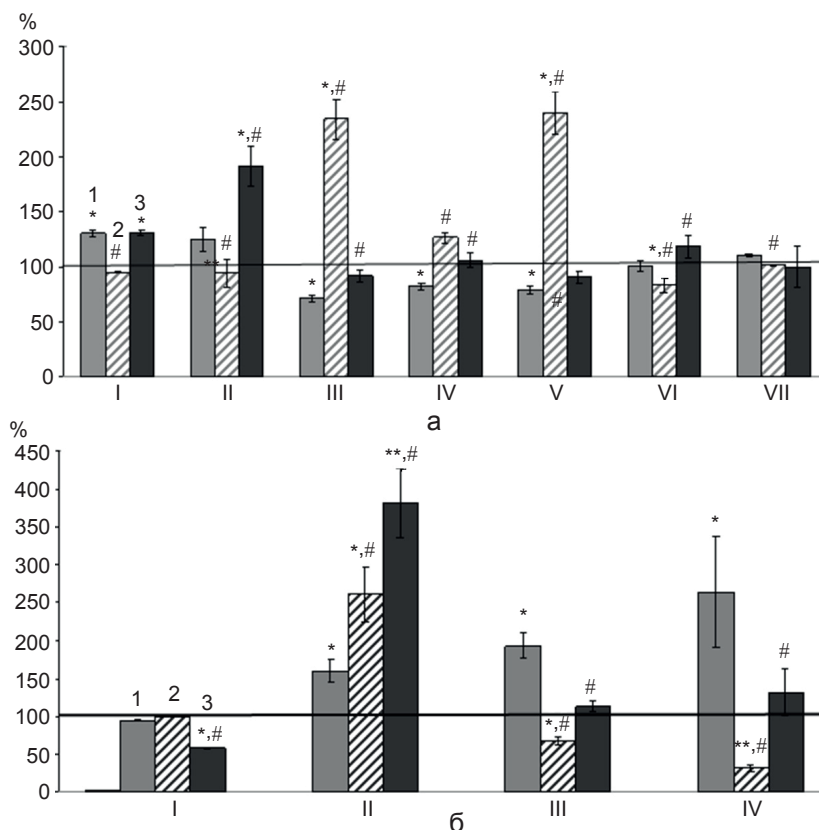


Рис.4. Зміна показників кардіогемодинаміки у щурів зі спонтанною гіпертензією (1), після помірного (2) і надмірного (3) режиму тренувань. На а: I – кінцево-систолічний тиск, II – кінцево-діастолічний тиск, III – ударний об'єм, IV – фракція викиду, V – хвилинний об'єм крові, VI – ударна робота, VII – частота серцевих скорочень. На б: I – $dP/dt \text{ min}$, II – споживання кисню серцем, III – артеріальна жорсткість, IV – кінцево-діастолічна жорсткість міокарда. * $P < 0,05$ відносно контролю, # $P < 0,05$ відносно значень у щурів зі спонтанною гіпертензією

зниження постнавантаження на серце. Після посиленого режиму вона зменшилася лише в 1,7 раза. Таким чином, помірне навантаження покращувало функцію розслаблення серця внаслідок збільшення максимальної швидкості зниження тиску і розтяжності лівого шлуночка, а зменшення артеріальної жорсткості за цього режиму тренувань свідчить про зниження загального периферичного опору судин.

Після обох режимів фізичного навантаження ми спостерігали зростання показників насосної функції серця (див. рис.4,а), але воно було більш виражене після помірних тренувань. Так, за цих умов хвилинний об'єм крові збільшився в 3 рази, а за надмірного – лише в 1,15 раза, ударний об'єм в 3,3 і 1,3 раза відповідно. Таким чином, збільшення ударного об'єму після НТ було в 2,5 раза меншим, ніж після ПТ, ($P < 0,05$). За обох режимів тренувань фракція викиду збільшилася (в 1,5 і в 1,28 раза відповідно). Слід зазначити, що після ПТ при збільшенні в 3,3 раза ударного об'єму, ударна робота зменшувалася на 17,2%, що вказує на збільшення ефективності роботи серця при менших енерговитратах. Після НТ ударна робота, навпаки, збільшилася на 17,8% порівняно зі щурами зі спонтанною гіпертензією і на 35% відносно тренуваних у помірному режимі тварин. Крім того, спостерігалось вірогідно більше підвищення споживання кисню міокардом після надмірних навантажень ($P < 0,05$), що свідчить про великі енергетичні витрати та напружену роботу серця для адаптації до них (див. рис.4,а). Виявлені нами зміни кардіогемодинаміки підтверджують важливість дозованості фізичних тренувань. НТ на межі функціональних можливостей тварин є суттєво енерговитратними, на що вказує збільшення в 2,3 раза споживання кисню міокарда. Відомо, якщо рівень енергії, що утворюється, зменшується, чи занадто збільшуються енерговитрати, це насамперед порушує функцію розслаблення, в той час як скоротливість і насосна функція серця при навантаженні ще не відрізняються від норми. Виявлене нами збільшення в 1,5 раза кінцевого

діастолічного тиску, зниження максимальної швидкості зниження тиску свідчать про порушення функції розслаблення серця. Для адаптації до великих навантажень серце вимушене підтримувати високий кінцевий діастолічний тиск, що може сприяти подальшому розвитку артеріальної гіпертензії.

Отже, тренування в обох досліджених режимах відновлювало спряжений стан кальційзалежних ферментів cNOS, можливо, завдяки запобіганню їх глутатіонування. Водночас за НТ спостерігали і надмірну оксигенацію мітохондрій серця, яка викликала в них надпродукцію окиснених метаболітів NO – як нітрит-, так нітрат-аніонів (див. рис.1,б). Це негативно вплинуло на фізіологічні показники. Виявилось, що великі фізичні навантаження на межі функціональних можливостей тварин неефективні для покращення функціонального стану серцево-судинної системи при гіпертензії і можуть провокувати її подальший розвиток (див. рис.4). Ще одним наслідком «переоксигенації» мітохондрій за надмірних тренувань є підвищення активності реверсного ферменту ксантинооксидази (див. рис. 1,б), про що свідчить зростання пулів сечової кислоти. Отже, надмірні фізичні навантаження на серце і викликана ними «переоксигенація» мітохондрій призводять до надмірного синтезу аденозинтрифосфату (АТФ), що викликає зростання не тільки «глибокої» деградації аденінових нуклеотидів (АТФ---АДФ---АМФ---ІМФ---гіпоксантин---ксантин---сечова кислота), але і генерації O_2^- , який утворюється при окисненні гіпоксантину і ксантину ксантинооксидазою [17]. На основі цих результатів можна зробити два висновки: по-перше, ксантинооксидаза за нормоксії і гіпероксії «працює» переважно як оксидаза, генеруючи O_2^- , в той час як в умовах гіпоксії – як нітрат- і нітрит-редуктаза, синтезуючи NO (аналогічно cNOS, можна говорити про неспряжений стан ксантинооксидази за оксигенації і, навпаки, спряжений стан при гіпоксії) [18–20]. По-друге, ксантинооксидаза, як і cNOS, зараховується до адап-

тивної системи швидкого взаєморегулювання пулів NO й $\cdot\text{O}_2^-$. Крім того, ми припустили функціональну компартменталізацію не лише різних пулів NO, але і пулів $\cdot\text{O}_2^-$ (можливі різні – регуляторна і токсична – функції різних пулів супероксиду, синтезованих, наприклад, ксантинооксидазою і неспряженими cNOS).

Механізм швидкого регулювання генерації $\cdot\text{O}_2^-$, про який ми говорили в II частині роботи, працює і в процесі адаптації до тривалих фізичних навантажень, чим і треба користуватися замість пошуку фармакологічних регуляторів реверсного неспряженого стану cNOS. Важливою для кардіопротекції за гіпертензії, як показують наші дослідження, може бути відновлення спряженого стану cNOS «симуляцією» фізичних навантажень, особливо тим, кому останні протипоказані, внаслідок фармакологічної регуляції «цистеїнового шунта». Аналогічно аргініновому шунту – конкурентне використання L-аргініну для синтезу NO різними NOS або аргіназою для синтезу сечовини, дієвість якого інгібуванням аргінази для профілактики і лікування артеріальної гіпертензії була передбачена і доведена в наших попередніх роботах [21,22]. У III частині роботи ми постулюємо важливе значення «цистеїнового шунта» (одночасне конкурентне використання L-цистеїну для індукційного *de novo* синтезу H_2S і для синтезу *de novo* відновленого глутатіону) для потреб практичної кардіології. Основою для такого твердження є встановлення нами залежності спряженого стану cNOS від стабільності невисоких кардіальних пулів H_2S . Цю залежність ми спостерігали за дії EMAP II (див. частину II) та за фізичного навантаження на серце (див. частину III). Раніше у відділі фізіології кровообігу було виявлено, що інгібування пропаргілгліцином *de novo* синтезу H_2S індукційним ферментом цистатіонін γ -ліазою в аорті старих щурів не тільки відновлює конститутивний синтез NO (очевидно, внаслідок відміни неспряженого стану cNOS), але і короткочасно повністю відновлює ендотеліозалежне скорочення гладеньких м'язів

аорти [23]. Отже, маємо уже три факти які підтверджують важливу роль «цистеїнового шунта» для відновлення порушених фізіологічних функцій. Нам видається доцільним для нормалізації роботи серцево-судинної системи використання помірному режиму фізичних тренувань або фармакологічного препарату нітрозоглутатіону (нині існує лише як хімічний реактив). Нітрозоглутатіон може бути ефективним інгібітором глутатіонування cNOS, а, отже, і їх неспряження.

ВИСНОВКИ

1. Помірні фізичні навантаження в серці щурів зі спонтанною гіпертензією зменшують інтенсивність генерації супероксиду, його токсичного похідного $\cdot\text{OH}$ -радикала, який викликає оксидативний стрес, пулів стабільного H_2O_2 і процесу ПОЛ внаслідок зниження активності ліпоксигенази, циклооксигеназ і ксантинооксидази, але не за рахунок мітохондріального супероксиду.

2. У мітохондріях серця щурів зі спонтанною гіпертензією за інтенсивних фізичних навантажень в надмірному режимі швидкість генерації супероксиду не знижується внаслідок стабільної активності ліпоксигенази й циклооксигеназ та підвищення активності ксантинооксидази, але значно знижується його ферментативне перетворення в H_2O_2 й неферментативне утворення токсичного $\cdot\text{OH}$ -радикала і викликаного ним процесу ПОЛ.

3. У серці щурів зі спонтанною гіпертензією за фізичних навантажень активність кальційзалежних NOS (eNOS і/чи nNOS), а, значить, і конститутивного *de novo* синтезу NO, надмірно підвищується, тоді як пули стабільних метаболітів NO змінюються реципрокно – пули нітрит-аніона підвищуються, тоді як пули нітрат-аніона – знижуються майже до його невисоких контрольних значень.

4. За різних режимів тренувань у серці щурів зі спонтанною гіпертензією зникають передумови виникнення нітрозативного стресу внаслідок зниження генерації над-

лишкового оксиду азоту кальційнезалежною iNOS і нітратредуктазою за помірного, але не надмірного режиму, за якого (внаслідок зниження оксигенації) реутилізаційний синтез оксиду азоту може посилюватися.

5. У мітохондріях серця щурів зі спонтанною гіпертензією за надмірних фізичних навантажень нормалізується знижена активність cNOS за рахунок відновлення її сполученого стану, але пули нітриту і нітрату при цьому надмірно зростають внаслідок збереження надлишкового синтезу NO кальційнезалежною iNOS і за рахунок декомпозиції нітрозоглутатіону.

6. Помірні фізичні тренування покращували функцію розслаблення серця щурів зі спонтанною гіпертензією за рахунок збільшення максимальної швидкості зниження тиску, зменшення кінцевого діастолічного тиску, а також постнавантаження на серце, сприяючи більш ефективній і енергоекономній роботі серця.

7. Надмірні фізичні навантаження на межі функціональних можливостей тварин не ефективні для покращення функціонального стану серцево-судинної системи при гіпертензії і можуть провокувати її подальший розвиток.

Н.А. Дорофеева, А.В. Коцюруба, Б.С. Копьяк, В.Ф. Сагач

ФИЗИЧЕСКИЕ ТРЕНИРОВКИ ВОССТАНАВЛИВАЮТ СОПРЯЖЕННОЕ СОСТОЯНИЕ КОНСТИТУТИВНЫХ NO-СИНТАЗ И КАРДИОГЕМОДИНАМИКУ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИИ (ЧАСТЬ III)

В сердце и митохондриях сердца крыс со спонтанной гипертонией исследовали влияние периодических физических нагрузок (плавание в умеренном и чрезмерном режиме тренировок) на физиологические показатели кардиогемодинамики и биохимические показатели, характеризующие уровень оксидативного и нитрозативного стресса. На основании последних рассчитывали индекс сопряжения конститутивных кальцийзависимых NO-синтаз (cNOS=eNOS + nNOS) и биохимический индекс дисфункции. Оказалось, что за обоих режимов тренировок полностью восстанавливается и даже превышает контрольные значения у нетренированных крыс линии Вистар сопряженное состояние cNOS и кальцийзависимый синтез оксида азота (NO), нарушенный в сердце и его

митохондриях крыс со спонтанной гипертонией. Большие физические нагрузки на границе функциональных возможностей оказались неэффективными для улучшения функционального состояния сердечно-сосудистой системы при гипертонии и могут провоцировать её дальнейшее развитие. Умеренный режим физических тренировок, наоборот, улучшал функцию расслабления сердца вследствие увеличения максимальной скорости снижения давления, уменьшения конечного диастолического давления, а также значительного снижения конечно-диастолической жесткости миокарда. Умеренные физические тренировки снижали периферическое сопротивление и постнагрузку на сердце, на что указывает снижение конечного систолического давления и артериальной жесткости, что способствовало более эффективной и энергоэкономной работе сердца, о чём свидетельствует уменьшение его ударной работы при увеличении ударного объема. Улучшение физиологических показателей кардиогемодинамики и функционального состояния сердца при умеренном режиме тренировок коррелировало с изменениями обеих рассчитанных индексов. Периодические интенсивные физические нагрузки рекомендовано как простой физиологический способ preconditionирования для профилактики развития кардиальной дисфункции при гипертонии как результат развития несопряженного состояния cNOS и вызванного им чрезмерной генерации супероксида, и наоборот, угнетение кальцийзависимого синтеза NO.

Ключевые слова: гипертония; физические тренировки; сопряжение cNOS; сердце; митохондрии сердца; крысы.

N.A. Dorofeyeva, A.V. Kotsuruba, B.S. Kopyak, V.F. Sagach

PHYSICAL EXERCISE TRAINING CANCELS CONSTITUTIVE NOS UNCOUPLING AND INDUCED VIOLATIONS OF CARDIAC HEMODYNAMICS IN HYPERTENSION (PART III)

In the heart and heart mitochondria spontaneously hypertensive rats investigated the effect of physical exercise training (swimming in a moderate and excessive training mode) on the physiological indicators of cardiac hemodynamics and biochemical parameters that characterize the level of oxidative and nitrosative stress. The index of coupling Ca^{2+} -dependent constitutive NO-synthases (cNOS = eNOS + nNOS) and biochemical index of dysfunction were calculated. It turned out that both modes of training is completely restored, and even exceed the reference values in untrained rats Wistar conjugate cNOS state and Ca^{2+} -dependent synthesis of nitric oxide (NO). Intensity regime of exercise on the border of functionality have been ineffective for improving the functional state of the cardiovascular system and hypertension can provoke it further. Moderate physical training regime, on the contrary, improves the diastolic function of the heart due to an increase dP/dtmin, reducing end-diastolic pressure and a significant reduction in end-diastolic stiffness. Moderate exercise decreased peripheral

resistance and cardiac afterload, as indicated by the decrease in end-systolic pressure and arterial stiffness, which contributed to more efficient and energy-saving of heart work. Improve physiological indicators of cardiac hemodynamics and functional state of the heart in moderate mode of training correlated with changes in both the calculated indices. Moderate mode of training is recommended as a simple physiological preconditioning method for the prevention of cardiac dysfunction, hypertension as a result of state uncoupling eNOS and the resulting excessive generation of superoxide and, conversely, inhibition of Ca²⁺-dependent synthesis of NO.

Key words: hypertension; exercise training; eNOS; heart; mitochondria, rats.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Calvert JM, Lefer DJ. Role of beta-adrenergic receptors and nitric oxide signaling in exercise-mediated cardioprotection. *Physiology (Bethesda)*. 2013; 28(4): 216-24.
2. Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Quindry JC. Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology (Bethesda)*. 2014; 29(1): 27-38.
3. Di Francescomarino S, Sciarilli A, Di Valerio V, Di Daldassarre M, Gallina S. The effect of physical exercise on endothelial function. *SportVtd*. 2009; 39(10): 797-812.
4. Skrypnik D, Bogdariski P, Madry E, Pupek-Musialik D, Walkowiak J. Effect of physical exercise on endothelial function, indicators of inflammation and oxidative stress. *PolMercurLecarski*. 2014; 36(212): 117-21. [Polish].
5. Golbidi S, Laher I. Exercise and the aging endothelium. *JDiabetesRes*. 2013: 789607.
6. Calvert JW, Condit ME, Aragon JP, Nicolson CK, Moody BF, et al. Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res*. 2011; 108(12): 1448-58.
7. Yang L, Jia Z, Yang L, Zhu M, Zhang J, et al. Exercise protects against chronic beta-adrenergic Remodelling of the heart by activation of endothelial nitric oxide synthase. *PLoSOne*. 2014 9(5) e96892.
8. Barhoumi T, Briet M, Kasal DA, Fraulob-Aquino JC, Idris-Klodia N, et al. Erythropoietin-induced hypertension and vascular injury in mice overexpressing human endothelin-1: exercise attenuated hypertension, oxidative stress, inflammation and immune response. *J Hypertens*. 2014 32(4) 784-94.
9. Mizuno M, Iwamoto GA, Vongpatanasin W, Mitchell JH, Smith SA. Exercise training improves functional sympatholysis in spontaneously hypertensive rats through a nitric oxide-dependent mechanism. *AmJPhysiolHeartCirc Physiol*. 2014 307(2) H242-51.
10. Farah C, Kleindienst A, Bolea G, Meyer G, Gayard S, et al. Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *BasicResCardiol*. 2013 108(6) 389.
11. Chen C-A, Wang T-Y, Varadharaj S, Reyes L.R, Hemann C, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature*. 2010; 468(7327): 1115.
12. Galougahi KK, Liu C-C, Gentile C, Kok C, Andrea Nunez A, et al. Glutathionylation Mediates Angiotensin II-Induced eNOS Uncoupling, Amplifying NADPH Oxidase-Dependent Endothelial Dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:1-11.
13. Pacher P, T.Nagayama, P. Mukhopadhyay, S.Batkai, D. A. Kass Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat. Protoc*:2008,3, № 9:1422-34.
14. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh*. 2014; 60(3):11-7. [Ukrainian].
15. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. *Fiziol Zh*. 2014; 60(5):3-13. [Ukrainian].
16. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res*. 2007; 75(2): 283-90.
17. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*. 2004;555(Pt 3):589-606.
18. Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenhalt R, Harrison R, Blake DR. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett*. 1998;427(2):225-8.
19. Weidert ER, Schoenborn SO, Cantu-Medellin N, Choughule KV, Jones JP, Kelley EE. Inhibition of xanthine oxidase by the aldehyde oxidase inhibitor raloxifene: implications for identifying molybdopterin nitrite reductases. *Nitric Oxide*. 2014;37:41-5.
20. Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, et al. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem*. 2000;275(11):7757-63.
21. Sahach VF, Kotsiuruba AV, Baziliuk OV, Mehed' OF, Stepanenko LH. Inhibitors of arginase pathway in L-arginine metabolism as a new class of antihypertensive drugs: action of urea on oxidative and nonoxidative metabolism of L-arginine and vascular tone in chronic hypertension. *Fiziol Zh*. 2004;50(6):9-18. [Ukrainian].
22. Sahach VF, Baziliuk OV, Kotsiuruba AV, Buzhanevich OM. Disorders of endothelium-dependent vascular reactions and of the arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism in arterial hypertension. *Fiziol Zh*. 2000;46(3):3-13. [Ukrainian].
23. Drachuk KO, Kotsiuruba AV, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Sagach VF. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle in old rats. *Fiziol Zh*. 2014;60(4):3-10. [Ukrainian].

Матеріал надійшов до редакції 05.05.2015