

## ВПЛИВ ГОСТРОЇ ГІПОКСИЧНОЇ ГІПОКСІЇ НА ОКИСНИЙ І НЕОКИСНИЙ ШЛЯХИ МЕТАБОЛІЗМУ L-АРГІНІНУ В МІОКАРДІ ТА АОРТІ ЩУРІВ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ

**Вступ.** Оксид азоту (NO) є унікальним фактором регуляції тонусу судин, важливою складовою кровотока киснепостачання в організмі людини і тварин. З віком його рівень поступово знижується при гіпоксії, в тому числі при так званих вікозалежних, перш за все хворобах серцево-судинної системи.

**Мета дослідження** – вивчити рівень стабільних метаболітів оксиду азоту, активність ензимів окисного (NO-синтази) і неокисного (аргінази) шляхів метаболізму L-аргініну, вміст карбаміду за дії гострої гіпоксичної гіпоксії в щурів різного віку.

**Методи дослідження.** Досліди проведено з використанням безпородних білих щурів-самців 2 вікових груп: 6–8-місячних (дорослих) і 24–26-місячних (старих). Дослідних тварин піддавали впливу гострої гіпоксичної гіпоксії. Евтаназію контрольних і дослідних щурів здійснювали через 24 год після завершення “спуску”, проводили забір крові, вилучали серце й аорту. Визначали вміст стабільних метаболітів оксиду азоту (нітритів і нітратів), активність ендотеліальної та індуцибельної NO-синтаз, вміст карбаміду і L-аргініну.

**Результати й обговорення.** За дії гіпоксії вміст стабільних метаболітів NO в міокарді дорослих щурів, порівняно з контрольними, вірогідно збільшувався, у старих – лише децю зростав рівень нітратів (на 20 %). У старих дослідних тварин, на відміну від дорослих, активність ендотеліальної NO-синтази в міокарді нижча (на 17 %), натомість активність індуцибельної NO-синтази перевищувала її рівень у контрольних щурів майже у 2 рази (на 107 %). У плазмі крові за впливу гіпоксії вміст нітратів зростав у тварин обох вікових груп, більшою мірою – у старих (на 68 %). У плазмі крові старих щурів у стані фізіологічного спокою вміст карбаміду перевищував такий у дорослих (на 40 %). За впливу гіпоксії вміст карбаміду в плазмі крові дорослих тварин збільшувався (на 69 %), а в плазмі старих – не змінювався і дорівнював його вмісту в дорослих. Вміст L-аргініну був однаковим у плазмі крові щурів обох вікових груп у стані фізіологічного спокою і залишався на такому ж рівні після дії гіпоксії.

**Висновки.** Підтримання відносно стабільного рівня нітритів і нітратів у міокарді старих дослідних щурів відбувається, на відміну від дорослих, виключно за рахунок зростання активності індуцибельної NO-синтази. Причиною цього явища може бути інгібування ендотеліальної NO-синтази, яке викликане індуцибельною NO-синтазою за умов дії вираженої експресії шляхом надлишкового продукування оксиду азоту. Активація неокисного шляху L-аргініну може спричинити обмеження синтезу NO інгібуванням індуцибельної NO-синтази, а також шляхом конкуренції за спільний субстрат. Співвідношення шляхів метаболізму L-аргініну значною мірою залежать від гіпоксії та розвитку адаптації. Після впливу гіпоксії аргіназна активність знижується в дорослих тварин, а в старих – залишається на рівні контрольних. Що стосується плазми крові, то зростання рівня карбаміду в ній вказує на достатню адаптованість організму до дії гострої гіпоксії, чого не відбувається у старих щурів. Оскільки вміст L-аргініну в міокарді та плазмі крові контрольних і дослідних щурів обох вікових груп однаковий та не змінюється за впливу гіпоксії, можна говорити про достатню субстратну забезпеченість NO-синтазних реакцій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оксид азоту; індуцибельна NO-синтаза; ендотеліальна NO-синтаза; гіпоксія.

ВСТУП. Особливе місце посідає гіпоксія, яка виникає за фізіологічних умов функціонування та розвитку організму. Гостра нестача кисню супроводжується збільшенням утворення оксиду азоту (NO) культурою ендотеліоцитів та стимуляцією експресії NO-синтази [1]. Триваліша гіпоксія (24 год і більше) за таких же умов пригнічує синтез оксиду азоту NO-синтазою ендотеліальних клітин de novo [2].

Стимуляція синтезу NO має протекторний характер, оскільки перешкоджає адгезії тромбоцитів до ендотелію судин. За нестачі кисню в барокамері у щурів, а також у пацієнтів з ішемічною хворобою серця та іншими серцево-судинними захворюваннями, що на певних етапах супроводжуються розвитком гіпоксії, інтенсивність генерації оксиду азоту зростає, про що свідчить збільшення вмісту його

© Н. М. Малевич, Т. Я. Ярошенко, 2021.

стабільних метаболітів у біологічних рідинах [3]. Утім за суттєвого дефіциту кисню продукування NO може зростати не тільки за рахунок підвищення його синтезу з L-аргініну, оскільки цей шлях потребує значної концентрації кисню, а й через активацію нітрит/нітрат-редуктазної компоненти (ензимної і неензимної) циклу азоту шляхом відновлення нітритів/нітратів до NO [4]. Рівень NO поступово знижується з віком, навіть до 75 % у 70–80-річних порівняно зі здоровими 20-річними [5].

Мета дослідження – вивчити рівень стабільних метаболітів оксиду азоту, активність ензимів окисного (NO-синтази) і неокисного (аргінази) шляхів метаболізму L-аргініну, вміст карбаміду за дії гострої гіпоксичної гіпоксії в щурів різного віку.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проведені з використанням безпородних білих щурів-самців 2 вікових груп: 6–8-місячних (дорослих) і 24–26-місячних (старих). Їх поділили на 2 групи: контрольні (інтактні тварини) та дослідні. Дослідних тварин піддавали впливу гострої гіпоксичної гіпоксії.

Групи тварин утримували на стандартному харчовому раціоні виварію протягом усього періоду та з вільним доступом до води для пиття. Гіпоксію моделювали шляхом “підняття” щурів на висоту 6000 м над рівнем моря, що відповідає 7,2 % кисню у повітрі. “Підняття” і “спуск” виконували зі швидкістю 1000 м/хв, експозиція на “висоті” дорівнювала 3 год. Евтаназію контрольних і дослідних щурів здійснювали шляхом тотального кровопускання із серця після попереднього використання тіопентал-натрієвого наркозу (60 мг·кг<sup>-1</sup> маси тіла тварини внутрішньочеревно) через 24 год після завершення “спуску”, проводили забір крові, вилучали серце та аорту.

З крові одержували плазму (3000 об./хв, 15 хв), серце та аорту гомогенізували у трис-НСІ буфері (50 ммоль/л, рН – 7,4, містить 1 ммоль/л ЕДТА) і використовували під час досліджень.

Стабільні метаболіти оксиду азоту (нітрити і нітрати) визначали у безбілкових аліквотах плазми крові та гомогенатів міокарда й аорти (депротеїнізація 30 % розчином ZnSO<sub>4</sub>, 20:1 за об’ємом) спектрофотометричним методом: рівень нітрит-аніонів вимірювали за методом Грін з використанням реактиву Гріса [6], нітрат-аніонів – після їх відновлення до нітритів [7].

Активність ендотеліальної NO-синтази (eNOS) визначали в субстратній суміші об’ємом 3,0 мл, яку інкубували протягом 20 хв при температурі 37 °С. Інкубаційна суміш складалася з: 2,5 мл 0,1 моль/л трис-НСІ буфера (рН 7,4), 1,0 мл 10 ммоль/л хлористого кальцію, водного

розчину 0,1 мл 1 ммоль/л NADPH+H<sup>+</sup>, L-аргініну (“Sigma”, США), кінцева концентрація якого становила 10 мкмоль/л. Реакцію ініціювали, додаючи 0,1 мл гомогенату тканин (співвідношення тканина/буфер 1:7). Реакцію зупиняли 0,1 мл 30 % розчину сульфату цинку. Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і протеїн, попередньо денатурований 0,1 мл 30 % розчину сульфату цинку. Вміст NADPH+H<sup>+</sup> визначали спектрофотометричним методом [8].

Активність індукцибельної NO-синтази (iNOS) визначали аналогічним методом, але іони кальцію заміщували 1 ммоль/л ЕДТА для зв’язування ендогенних іонів кальцію [9].

Вміст карбаміду та L-аргініну виражали у мкмоль/г тканини та мкмоль/мл плазми і визначали на напівавтоматичному аналізаторі “HUMALYZER 2000” з використанням тест-систем “Human” (Німеччина).

При проведенні досліджень користувались загальними принципами експериментів на тваринах, узгодженими з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [10].

Результати досліджень піддавали статистичному аналізу [11] за допомогою статистичної програми STATISTICA 6.0 з використанням параметричного критерію Ст’юдента і непараметричного критерію Вілкоксона для зв’язаних вибірок. Зміни вважали вірогідними при p≤0,05.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Оксид азоту є унікальним фактором регуляції тону судин, важливою складовою кровотока та киснепостачання в організмі людини і тварин. Шляхом вазодилатації судин, інгібування агрегації тромбоцитів та адгезії нейтрофілів до судинної стінки він забезпечує оптимальний рівень кровопостачання тканин за дефіциту кисню, впливу інших чинників, а також захворювань, що супроводжуються розвитком гіпоксії, в тому числі так званих вікозалежних, перш за все хвороб серцево-судинної системи. Як відомо, оксид азоту *de novo* синтезується за окисного метаболізму L-аргініну різними ізоформами NO-синтаз (ендотеліальною, нейрональною, індукцибельною). Неокисний (гідролізний) шлях перетворення L-аргініну відбувається з участю різних форм аргіназ (AI, AII). З участю NO-синтаз утворюються оксид азоту (також супероксид-аніон, перекис водню, пероксинітрит) і цитрулін, з участю аргіназ – орнітин та карбамід. Останні є інгібіторами iNOS. Тому активація неокисного шляху метаболізму L-аргініну може спричинити обмеження синтезу оксиду азоту як за рахунок інгібування iNOS, так

і за рахунок конкуренції за спільний субстрат (L-аргінін) між NO-синтазами й аргіназами.

За нестачі кисню активується також нітрит/нітрат-редуктазний шлях відтворення молекули оксиду азоту з його стабільних метаболітів – нітритів і нітратів. Це так звана редуктазна компонента, що разом із NO-синтазним шляхом становить цикл системи NO, який функціонує в організмі ссавців.

#### NO-синтазний шлях утворення оксиду азоту

Продуктування оксиду азоту в серцевому м'язі й аорті оцінювали за вмістом його стабільних метаболітів (нітритів і нітратів) та величиною активності NO-синтаз. Наведені в таблиці 1 дані свідчать про те, що у стані фізіологічного спокою рівень стабільних метаболітів оксиду азоту в міокарді й аорті дорослих і старих щурів статистично не відрізнявся, натомість NO-синтазна активність серцевого м'яза у старих тварин, порівняно з дорослими, була значно нижчою (табл. 2). Зменшення NO-синтазної активності мало б призвести до зниження синтезу NO  $de\ novo$  і, відповідно, зменшення вмісту  $NO_2^-$  та  $NO_3^-$ . Проте цього не відбувалося, можливо, внаслідок активації за старіння нітрит/нітрат-редуктазних систем. Відомо, що активність цього складового компонента циклу оксиду азоту значно зростає за умов дефіциту кисню і може в 100 разів перевищувати активність NO-синтаз. На користь цього припущення можуть свідчити

дані щодо розвитку в старому організмі тканинної гіпоксії, яка мала б сприяти останньому [2]. Разом із тим, вміст у плазмі крові нітратів, які, на погляд багатьох дослідників, є маркером продукування NO в цілісному організмі, у старих щурів менший за такий у дорослих на 22 % ( $4,11 \pm 0,39$ ) і ( $5,32 \pm 0,57$ ) нмоль/мл, що, найімовірніше, зумовлено зниженням активності eNOS в аорті в старості [1]. Менший рівень NO-синтазної активності в міокарді старих щурів порівняно з дорослими може бути пов'язаний із кількома чинниками. По-перше, це може бути викликано зниженням експресії відповідних генів NO-синтаз, по-друге – дисфункцією NO-синтаз унаслідок змін у процесі старіння вмісту і співвідношення субстратів та окремих кофакторів, необхідних для нормального функціонування цих складних ензимів, і, як результат, зменшення синтезу оксиду азоту на користь супероксид-аніона і пероксинітриту. Втім, за нашими даними, рівень основного субстрату ензимної реакції – L-аргінину – зі збільшенням віку щурів не змінювався і становив у плазмі крові дорослих тварин ( $1,93 \pm 0,08$ ) нмоль/мл, у старих – ( $2,17 \pm 0,10$ ) нмоль/мл, у міокарді – ( $3,08 \pm 0,36$ ) та ( $3,29 \pm 0,35$ ) нмоль/мл відповідно. Крім того, слід брати до уваги і вірогідність збільшення використання оксиду азоту в реакціях нейтралізації супероксидного радикала, оскільки активність супероксиддисмутази (мітохондріальної і цитозольної ізоформ) за старіння знижується.

Таблиця 1 – Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в крові й тканинах дорослих і старих щурів за умов гострої гіпоксичної гіпоксії ( $M \pm m$ )

Показник	Дорослі щури		Старі щури	
	контроль	дослід	контроль	дослід
Плазма крові				
$NO_3^-$ , нмоль/л	$13,4 \pm 0,3$	$14,0 \pm 0,7^*$	$7,0 \pm 0,1^{\#}$	$13,1 \pm 0,3^*$
Міокард				
$NO_2^-$ , нмоль/г тканини	$123,1 \pm 10,2$	$232,5 \pm 9,8^*$	$118,7 \pm 12,4$	$142,3 \pm 10,2^{\#}$
$NO_3^-$ , нмоль/г тканини	$95,3 \pm 1,7$	$92,6 \pm 2,1$	$86,2 \pm 2,3$	$110,1 \pm 1,9^*$
Аорта				
$NO_2^-$ , нмоль/г тканини	$36,9 \pm 1,7$	$92,6 \pm 2,1$	$23,2 \pm 2,3^{\#}$	$57,1 \pm 1,9^*$
$NO_3^-$ , нмоль/г тканини	$64,5 \pm 1,3$	$54,6 \pm 1,1$	$51,3 \pm 1,2^{\#}$	$70,6 \pm 1,1^*$

Примітки. Тут і в таблицях 2, 3:

1. \* – статистично значуща вірогідність порівняно з контрольними тваринами ( $p < 0,05$ ).

2. # – статистично значуща вірогідність порівняно з дорослими щурами ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 2 – NO-синтазна активність у міокарді та аорті щурів різного віку за умов гострої гіпоксичної гіпоксії ( $M \pm m$ )

Показник	Дорослі щури		Старі щури	
	контроль	дослід	контроль	дослід
Міокард				
eNOS, нмоль/мг тканини·хв	$0,155 \pm 0,013$	$0,180 \pm 0,011^*$	$0,128 \pm 0,07^{\#}$	$0,140 \pm 0,06$
iNOS, нмоль/мг тканини·хв	$0,129 \pm 0,011$	$0,159 \pm 0,08^*$	$0,110 \pm 0,02^{\#}$	$0,206 \pm 0,01^*$
Аорта				
eNOS, нмоль/мг тканини·хв	$0,066 \pm 0,003$	$0,089 \pm 0,001^*$	$0,071 \pm 0,005$	$0,068 \pm 0,004$
iNOS, нмоль/мг тканини·хв	$0,077 \pm 0,004$	$0,100 \pm 0,005^*$	$0,061 \pm 0,002$	$0,062 \pm 0,003^{\#}$

За дії гіпоксії вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в міокарді дорослих щурів, порівняно з контрольними, вірогідно збільшувався, у старих – лише дещо зростав рівень нітратів (на 20 %). Це відбувалося в дорослих тварин за більш високого, ніж у контрольних, рівня NO-синтазної активності. У старих дослідних щурів, на відміну від дорослих, активність eNOS у міокарді нижча (на 17 %), натомість активність iNOS перевищувала її рівень у контрольних тварин майже у 2 рази (на 107 %). У плазмі крові за впливу гіпоксії вміст нітратів зростав у тварин обох вікових груп, більшою мірою – у старих (на 68 %), сягаючи однакового рівня незалежно від віку.

Оцінюючи одержані результати, слід враховувати, що за дії гіпоксії в інтервальному режимі можуть відбуватися і, напевно, відбуваються адаптивні зрушення. Це припущення підтверджується зростанням у плазмі крові вмісту карбаміду, який вважають маркером адаптації організму до дії різних екстремальних чинників, проте лише в дорослих щурів (з  $3,56 \pm 0,30$  до  $6,03 \pm 0,18$  мкмоль/мл). У старих дослідних щурів його рівень залишався незмінним і дорівнював  $5,00 \pm 0,59$  мкмоль/мл, у контрольних –  $5,96 \pm 0,30$  мкмоль/мл. Відомо також, що названу модель дослідники використовують з метою адаптації організму до дії різних екстремальних чинників. Вищу NO-синтазну активність у міокарді щурів після закінчення гіпоксії, порівняно з контрольними, можна розцінювати як адаптивну реакцію організму, що спрямована на забезпечення оптимального за цих умов рівня синтезу оксиду азоту. Втім вміст стабільних метаболітів NO в міокарді щурів при цьому не перевищував притаманного контрольним тваринам, що може бути наслідком збільшення депонування оксиду азоту, що завжди супроводжує зростання його синтезу [4].

Привертає увагу і той факт, що підтримання відносно стабільного рівня нітритів і нітратів у міокарді старих дослідних щурів відбувалося, на відміну від дорослих, виключно за рахунок зростання активності індуцибельної NO-синтази. Останнє може призвести до небажаних наслід-

ків, а саме: зростання продукування супероксидного радикала, накопичення токсичного пероксинітриту, розвитку окисного стресу. Водночас активність eNOS у міокарді старих дослідних щурів, порівняно з контрольними, вірогідно не змінювалася. Причиною цього явища може бути інгібування eNOS, яке викликане індуцибельною NO-синтазою, за умов дії вираженої експресії шляхом надлишкового продукування оксиду азоту.

#### Неокисний шлях перетворення L-аргініну

Добре відомо, що амінокислота L-аргінін, яка є попередником синтезу оксиду азоту родиною NO-синтаз, відіграє важливу роль у корекції гіпоксичного стану організму. В разі неокисного шляху перетворення L-аргініну різними ізоформами аргінази утворюються інгібітори NO-синтаз – орнітин і карбамід. З огляду на ці позиції, можна прогнозувати, що активація неокисного шляху L-аргініну спричиняє обмеження синтезу NO інгібуванням iNOS, а також шляхом конкуренції за спільний субстрат. Співвідношення шляхів метаболізму L-аргініну значною мірою залежать від гіпоксії та розвитку адаптації [4].

Відповідно до наведених у таблиці 3 даних, рівень карбаміду в міокарді дорослих і старих щурів у стані фізіологічного спокою не відрізнявся. За умов дії гіпоксії його вміст у міокарді дорослих дослідних тварин знижувався, у старих – залишався на рівні контрольних. Що стосується вмісту L-аргініну, то він був однаковим у контрольних щурів обох вікових груп та не змінювався за дії гіпоксії. У плазмі крові старих тварин у стані фізіологічного спокою вміст карбаміду перевищував такий у дорослих (на 40 %). Після закінчення впливу гіпоксії вміст карбаміду в плазмі крові дорослих щурів збільшувався (на 69 %), у старих – не змінювався і дорівнював його вмісту в дорослих. Вміст L-аргініну був однаковим у плазмі крові тварин обох вікових груп у стані фізіологічного спокою і залишався на такому ж рівні після дії гіпоксії.

**ВИСНОВКИ.** Отримані дані стосовно вмісту карбаміду в міокарді свідчать про те, що аргіназна активність у дорослих і старих контрольних

Таблиця 3 – Вплив переривчастої гіпобаричної гіпоксії на неокисний шлях перетворення L-аргініну в плазмі крові та міокарді щурів різного віку ( $M \pm m$ )

Показник	Дорослі щури		Старі щури	
	контроль	дослід	контроль	дослід
Міокард				
Карбамід, мкмоль/г тканини	4,50±0,41	3,30±0,21*	4,20±0,42	3,80±0,31
L-аргінін, мкмоль/г тканини	3,08±0,56	3,57±0,26	3,29±0,45	3,90±0,38
Плазма крові				
Карбамід, мкмоль/мл	3,56±0,30	6,03±0,18**	5,00±0,059#	5,96±0,30
L-аргінін, мкмоль/мл	1,93±0,08	2,03±0,18	2,17±0,10	2,28±0,021

щурів не відрізняється. Після впливу гіпоксії вона знижується в дорослих тварин, у старих – залишається на рівні контрольних. Це може свідчити про зменшення активності аргінази в міокарді дорослих щурів за умов гіпоксії. Останнє буде створювати більш оптимальні умови для функціонування NO-синтаз у дорослих тварин за умов дефіциту кисню. Що стосується плазми крові, то

зростання рівня карбаміду в ній вказує на достатню адаптованість організму до дії гострої гіпоксії, чого не відбувається у старих щурів. Оскільки вміст L-аргініну в міокарді та плазмі крові контрольних і дослідних щурів обох вікових груп однаковий і не змінюється за впливу гіпоксії, можна говорити про достатню субстратну забезпеченість NO-синтазних реакцій.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals / Petra Kleinbongard, André Dejam, Thomas Lauer, Tienush Rassa // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2003. – **35**. – P. 790–796. DOI: 10.1016 / s0891-5849 (03) 00406-4.
2. Ozdemir B. Could the decrease in the endothelial nitric oxide (NO) production and NO bioavailability be the crucial cause of COVID-19 related deaths? / B. Ozdemir, A. Yazici // *Medical Hypotheses*. – 2020. – **144**. – P. 109970. DOI: 10.1016 / j.mehy.2020.109970.
3. Lee A. Nitric oxide: a new role in resuscitation / A. Lee, W. Butt // *Crit Care Resusc.* – 2020. – **22**. – P. 72–79.
4. Devesh Tewari. Role of nitric oxide in neurodegeneration: Function, regulation, and inhibition / Devesh Tewari, Archana N. Sah, Sweta Bawari // *Current Neuropharmacology* том. – 2021. – **19**, No. 2. – P. 114–126. DOI: 10.2174/1570159X18666200429001549.
5. Torregrossa A. C. Nitric oxide and geriatrics: Implications in diagnostics and treatment of the elderly / A. C. Torregrossa, M. Aranke, N. S. Bryan // *J. Geriatr. Cardiol.* – 2011. – **8**. – P. 230–242.

6. Кіселик І. О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І. О. Кіселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // *Лаб. діагностика*. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
7. Орлова Е. А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности / Е. А. Орлова // *Укр. журн. екстремальной медицины*. – 2002. – **3**, № 1. – С. 79–82.
8. Сумбаев В. В. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге / В. В. Сумбаев, И. М. Ясинская // *Современные проблемы токсикологии*. – 2000. – № 3. – С. 3–7.
9. Alteration of NOS expression with aging and hypertension in rats / T. C. Chou, M. N. Yen, C. Y. Li, Y. A. Ding // *Hyperten.* – 1998. – **31**, No. 2. – P. 643–648.
10. Gross D. Ethics in animal-based research / D. Gross, R. Tolba // *Eur. Surg. Res.* – 2015. – **55** (1–2). – P. 43–57.
11. Okeh U. Statistical problems in medical research / U. Okeh // *East. Afr. J. Public. Health.* – 2009. – **6** (1). – P. 1–7.

#### REFERENCES

1. Kleinbongard, P., & Dejam, A., Lauer, T., Rassa, T. (2003). Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 790-796. DOI: 10.1016 / s0891-5849 (03) 00406-4.
2. Ozdemir, B., & Yazici, A. (2020). Could the decrease in the endothelial nitric oxide (NO) production and NO bioavailability be the crucial cause of COVID-19 related deaths? *Medical Hypotheses*, 144, 109970. DOI: 10.1016 / j.mehy.2020.109970.
3. Lee, A., & Butt, W. (2020). Nitric oxide: a new role in resuscitation. *Crit. Care Resusc.*, 22, 72-79.
4. Tewari, D., & Sah, A.N., Bawari, S. (2021). Role of nitric oxide in neurodegeneration: Function, regulation, and inhibition. *Current Neuropharmacology*, 19 (2), 114-126. DOI: 10.2174/1570159X18666200429001549.
5. Torregrossa, A.C., & Aranke, M., & Bryan, N.S. (2011). Nitric oxide and geriatrics: Implications in diagnostics and treatment of the elderly. *J. Geriatr. Cardiol.*, 8, 230-242.

6. Kiselyk, I.O., Lutsyk, M.D., & Shevchenko, L.Yu. (2001). Osoblyvosti vyznachennia nitrativ ta nitrytiv v peryferychnii krvi u khvorykh na virusni hepatyty ta pry syndromi zhovtianytsi inshoi etiologii [Features of determination of nitrates and nitrites in peripheral blood in patients with viral hepatitis and jaundice syndrome of other etiology]. *Laboratorna diahnozyka – Laboratory Diagnosis*, 3, 43-45 [Ukrainian]
7. Orlova, E.A. (2002). Analiz nitritov i nitratov v tkani pri eksperimentalnoy ostroy pochechnoy nedostatochnosti [Analysis of nitrites and nitrates in tissue in experimental acute renal failure]. *Ukr. zhurnal ekstremalnoy meditsyny – Ukrainian Journal of Extreme Medicine*, 3, 1, 79-82 [in Russian].
8. Sumbaev, V.V., & Yasinskaya, I.M. (2000). Vliyanie DDT na aktivnost sintazy oksida azota v pecheni, legkih i golovnom mozge [Effect of DDT on the activity of nitric oxide synthase in the liver, lungs and brain]. *Sovremennye problemy – Modern Problems*, 3, 3-7 [in Russian].

9. Chou, T.C., Yen, M.N., Li, C.Y., & Ding, Y.A. (1998). Alteration of NOS expression with aging and hypertension in rats. *Hyperten.*, 31, 2, 643-648.

10. Gross, D. & Tolba, R. (2015). Ethics in animal-based research. *Eur. Surg. Res.*, 55 (1-2), 43-57.

11. Okeh, U. (2009). Statistical problems in medical research. *East. Afr. J. Public. Health*, 6 (1), 1-7.

Н. М. Малевич, Т. Я. Ярошенко

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО  
МОЗ УКРАИНЫ

## ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ И НЕОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА L-АРГИНИНА В МИОКАРДЕ И АОРТЕ КРЫС В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

### Резюме

**Вступление.** Оксид азота (NO) является уникальным фактором регуляции тонуса сосудов, важной составляющей поставки крови и кислорода в организме человека и животных. С возрастом его уровень постепенно снижается при гипоксии, в том числе при так называемых возрастзависимых, в первую очередь болезнях сердечно-сосудистой системы.

**Цель исследования** – изучить уровень стабильных метаболитов оксида азота, активность ферментов окислительного (NO-синтазы) и неокислительного (аргиназа) путей метаболизма L-аргинина, содержание карбамида при воздействии острой гипоксической гипоксии у крыс разного возраста.

**Методы исследования.** Опыты проведены с использованием беспородных белых крыс-самцов 2 возрастных групп: 6–8-месячных (взрослых) и 24–26-месячных (старых). Опытных животных подвергали воздействию острой гипоксической гипоксии. Эвтаназию контрольных и опытных крыс осуществляли через 24 ч после завершения “спуска”, проводили забор крови, изымали сердце и аорту. Определяли содержание стабильных метаболитов оксида азота (нитритов и нитратов), активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз, содержание карбамида и L-аргинина.

**Результаты и обсуждение.** При воздействии гипоксии содержание стабильных метаболитов NO в миокарде взрослых крыс, по сравнению с контрольными, достоверно увеличивалось, у старых – лишь несколько возрастал уровень нитратов (на 20 %). У старых опытных животных, в отличие от взрослых, активность эндотелиальной NO-синтазы в миокарде более низкая (на 17 %), зато активность индуцибельной NO-синтазы превышала ее уровень у контрольных крыс почти в 2 раза (на 107 %). В плазме крови при воздействии гипоксии содержание нитратов возрастало у животных обеих возрастных групп, в большей степени – у старых (на 68 %). В плазме крови старых крыс в состоянии физиологического покоя содержание карбамида превышало таковое у взрослых (на 40 %). При влиянии гипоксии содержание карбамида в плазме крови взрослых животных увеличивалось (на 69 %), а в плазме старых – не менялось и приравнивалось к его содержанию у взрослых. Содержание L-аргинина было одинаковым в плазме крови крыс обеих возрастных групп в состоянии физиологического покоя и оставалось на таком же уровне после воздействия гипоксии.

**Выводы.** Поддержание относительно стабильного уровня нитритов и нитратов в миокарде старых опытных крыс происходит, в отличие от взрослых, исключительно за счет возрастания активности индуцибельной NO-синтазы. Причиной этого явления может быть ингибирование эндотелиальной NO-синтазы, которое вызвано индуцибельной NO-синтазой в условиях воздействия выраженной экспрессии путем избыточного продуцирования оксида азота. Активация неокислительного пути L-аргинина может повлечь ограничение синтеза NO ингибированием индуцибельной NO-синтазы, а также путем конкуренции за общий субстрат. Соотношение путей метаболизма L-аргинина в значительной степени зависит от гипоксии и развития адаптации. После влияния гипоксии аргиназная активность снижается у взрослых животных, а у старых – остается на уровне контрольных. Что касается плазмы крови, то возрастание уровня карбамида в ней указывает на достаточную адаптацию организма к воздействию острой гипоксии, чего не происходит у старых крыс. Поскольку содержание L-аргинина в миокарде и плазме крови контрольных и опытных крыс обеих возрастных групп одинаково и не меняется при воздействии гипоксии, можно говорить о достаточной субстратной обеспеченности NO-синтазных реакций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксид азота; индуцибельная NO-синтаза; эндотелиальная NO-синтаза; гипоксия.

## IMPACT OF ACUTE HYPOXIC HYPOXIA ON THE OXIDATIVE AND NON-OXIDATIVE PHASES OF L-ARGININE METABOLISM IN MYOCARDIUM AND AORTA OF RATS IN AGE ASPECT

### Summary

**Introduction.** Nitric oxide is a unique factor in the regulation of vascular tone, an important component of blood and oxygen supply in humans and animals. With age, NO levels gradually decrease in hypoxia, including the so-called age-dependent diseases, primarily of the cardiovascular system.

**The aim of the study** – to investigate the level of stable NO metabolites, the activity of enzymes of oxidative (NO-synthase), non-oxidative (arginase) phases of L-arginine metabolism, urea content under the action of acute hypoxic hypoxia in rats of different age.

**Research Methods.** The experiments were performed using outbred white rats – males of two age groups: 6–8 months (young adults) and 24–26 months (old adults). Experimental animals were exposed to acute hypoxic hypoxia. Euthanasia of control and experimental rats was conducted 24 h after completion of the "launch", then blood was taken, and the heart and aorta were removed. Stable metabolites (nitrites and nitrates of nitric oxide), endothelial and inducible NO-synthase activity, urea and L-arginine content were determined.

**Results and Discussion.** Under hypoxia, the content of stable metabolites of nitric oxide in the myocardium of the young adult rats increased significantly compared to control, in the old adult rats – only slight increase of the nitrate level was observed (by 20 %). In older experimental animals, in contrast to young adults, the activity of eNOS in the myocardium was lower (17 %); on the other hand, the activity of inducible NO synthase exceeded its level in controls almost twice (107 %). In the blood plasma under the influence of hypoxia, the content of nitrates increased in the rats of both age groups, but to a greater extent in the old adult rats (by 68 %). In the blood plasma of old adult rats at physiological rest, the content of urea exceeded that of young adult rats (40 %). The effect of hypoxia in young adult rats caused an increase in the content of urea in the blood plasma by 69 %, though in the plasma of the old adult rats this parameter did not change and was equal to its content in young adults. The content of L-arginine was the same in the blood plasma of rats of both age groups at physiological rest and remained at the same level after hypoxia.

**Conclusions.** Maintaining a relatively stable level of nitrites and nitrates in the myocardium of old experimental rats, in contrast to young adults, is solely due to the increased activity of inducible NO synthase. The reason for this phenomenon may be the inhibition of eNO-synthase, which is caused by inducible NO-synthase under the conditions of profound expression by the excessive production of nitric oxide. Activation of the L-arginine non-oxidative pathway can limit NO synthesis by inhibiting iNO synthase, as well as by competing for a common substrate. The ratio between L-arginine metabolism pathways depends largely on hypoxia and the development of adaptation. After exposure to hypoxia, arginase activity decreases in young adult rats, while in the old ones – remains at same level as in corresponding control group. As for blood plasma, the increase in the level of urea in it indicates a sufficient adaptation of the body to the effects of acute hypoxia, which does not occur in older rats. Since the content of arginine in the myocardium and blood plasma of control and experimental rats of both age groups is the same and does not change under the influence of hypoxia, we can prognose a sufficient substrate supply for NO-synthase reactions.

KEY WORDS: nitrogen oxide; inducible NO synthase; endothelial NO synthase; hypoxia.

Отримано 10.03.21

Адреса для листування: Т. Я. Ярошенко, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: yaroshenko@tdmu.edu.ua.