



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.014>
УДК 577.112.385.2:616.12-008.331.1]-074-053.2



Лукша А.В.¹✉, Максимович Н.А.¹, Гуляй И.Э.¹, Шулика В.Р.¹, Глазев А.А.², Клиса С.Д.², Козич А.А.³

¹ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

² Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

³ Гродненская областная детская клиническая больница, Гродно, Беларусь

Методология оценки NO-синтазной активности эндотелия сосудов детей с артериальной гипертензией

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн исследования, редактирование – Максимович Н.А.; дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста, редактирование – Лукша А.В.; обработка, редактирование – Гуляй И.Э., Шулика В.Р., Глазев А.А., Клиса С.Д., Козич А.А.

Подана: 31.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: drluksha@mail.ru

Резюме

Цель. Оценить NO-синтазную активность эндотелия сосудов путем определения плазменного уровня аргинина, eNOS и NOx у детей с артериальной гипертензией.

Материалы и методы. Обследовано 111 детей в возрасте от 14 до 18 лет, из них мальчиков – 77 (69,4%), девочек – 34 (30,6%). Медиана возраста обследуемых пациентов была равна 15,2 года (14,0–16,5). Все пациенты были разделены на 3 группы: 1-ю группу (n=51) составили дети с артериальной гипертензией, 2-ю группу (n=30) – дети с высоким нормальным артериальным давлением, 3-ю группу – 30 здоровых детей из групп периодического диспансерного наблюдения.

Результаты. Установлено, что уровень аргинина у детей с артериальной гипертензией выше по сравнению с таковым в группе контроля (p=0,02). Группа детей с артериальной гипертензией характеризовалась более низкими значениями концентрации eNOS и NOx по сравнению с группой здоровых детей (p=0,03, p=0,04 соответственно).

Выводы. У детей с артериальной гипертензией выявляются нарушения в системе L-аргинин-NO, характеризующиеся снижением синтеза NO вследствие низкой активности эндотелиальной синтазы оксида азота.

Ключевые слова: оксид азота, эндотелиальная синтаза оксида азота, L-аргинин, артериальная гипертензия, дети

Aliaksandr V. Luksha¹✉, Mikalai A. Maximovich¹, Irina E. Gulyai¹, Valentina R. Shulika¹, Anton A. Glazev², Sergey D. Klisa², Aliaksandr A. Kozich³

¹ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

² Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

³ Grodno Regional Children's Clinical Hospital, Grodno, Belarus

Methodology for Assessing the NO-synthase Activity of the Vascular Endothelium in Children with Arterial Hypertension

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, design of the study, editing – Mikalai A. Maximovich; design of the study, collection of material, processing, writing a text, editing – Aliaksandr V. Luksha; processing, editing – Irina E. Gulyai, Valentina R. Shulika, Anton A. Glazev, Sergey D. Klisa, Aliaksandr A. Kozich.

Submitted: 31.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: drluksha@mail.ru

Abstract

Purpose. To evaluate the NO-synthase activity of the endothelium by determining the plasma level of arginine, eNOS and NOx in children with arterial hypertension.

Materials and methods. 111 children aged 14 to 18 years were examined, including: 77 boys (69.4%), 34 girls (30.6%). The median age of the examined patients was 15.2 years (14.0–16.5). All patients were divided into 3 groups: the first group (n=51) consisted of children with arterial hypertension, the 2nd group (n=30) – with high normal blood pressure, the 3rd group – 30 healthy children.

Results. It was found that the level of arginine in children with arterial hypertension is higher compared to the control group ($p=0.02$). The group of children with arterial hypertension was characterized by lower concentrations of eNOS and NOx compared to the group of healthy children ($p=0.03$, $p=0.04$, respectively).

Conclusions. In children with arterial hypertension, disturbances in the L-arginine-NO system are revealed, characterized by a decrease in NO synthesis due to low activity of endothelial nitric oxide synthase.

Keywords: nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, L-arginine, arterial hypertension, children

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время функциональному состоянию эндотелия придается большое значение при изучении этиологии, патогенеза и прогрессирования артериальной гипертензии. Одним из основных вазоактивных метаболитов, определяющих регуляцию сосудистого тонуса, является эндотелиальный фактор релаксации – оксид азота (NO) [1–3]. Известно, что NO непрерывно продуцируется ферментативным путем и выполняет функции универсального мессенджера внутри- и межклеточной сигнализации [4].



NO представляет собой восстановленную форму монооксида азота с периодом полураспада от 2 до 30 секунд, которая образуется посредством окисления терминальной группы гуанидина аминокислоты L-аргинина [1, 3]. Считают, что без участия L-аргинина невозможна системная и локальная регуляция тонуса гладкомышечного слоя стенки сосудов [5].

L-аргинин является основным субстратом для синтазы оксида азота (NOS), которая продуцирует NO [6, 7]. В настоящее время идентифицированы три изоформы NOS: NOS-1 – нейрональная (nNOS) или мозговая (bNOS), NOS-2 – индуцибельная (iNOS) или макрофагальная (mNOS) и NOS-3 – эндотелиальная (eNOS) [3, 7]. Две изоформы (nNOS и mNOS) локализованы главным образом в цитоплазме клеток, eNOS содержится в мембранах клетки. Все изоформы NOS катализируют образование NO, имеют сходную структуру, однако механизм действия, локализация каждой изоформы и биологический эффект имеют специфические особенности [7–9]. Известны научные данные о существовании четвертой изоформы – митохондриальной NOS (mtNOS), убедительно подтверждающие участие митохондрий в продукции NO [7, 10].

В норме образование NO происходит в основном с участием eNOS (nNOS продуцируют NO в очень малых количествах) [11]. Функциональная роль eNOS и ее способность синтезировать NO определяется как уровнем экспрессии самого фермента в тканях, так и процессами, приводящими к изменению ее активности. При эндотелиальной дисфункции отмечается нарушение синтеза и биодоступности NO вследствие подавления экспрессии/инактивации eNOS, уменьшения уровня L-аргинина, кофакторов NO-синтазы, повышения содержания эндогенных ингибиторов NO или из-за повышенного распада NO активными формами кислорода [10, 12, 13]. Поэтому изменение плазменной концентрации основных компонентов системы L-аргинин-NO может выступать в качестве раннего биохимического маркера сосудистого повреждения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить NO-синтазную активность эндотелия сосудов путем определения плазменного уровня аргинина, eNOS и NOx у детей с артериальной гипертензией.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 111 детей в возрасте от 14 до 18 лет, из них мальчиков – 77 (69,4%), девочек – 34 (30,6%). Медиана возраста обследуемых пациентов была равна 15,2 года (14,0–16,5). Все пациенты были разделены на 3 группы: 1-ю группу (n=51) составили дети с артериальной гипертензией, 2-ю группу (n=30) – дети с высоким нормальным артериальным давлением, 3-ю группу – 30 здоровых детей из групп периодического диспансерного наблюдения.

Содержание аргинина в плазме крови определяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией [14].

Количественное определение уровня эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) в плазме крови проводилось с помощью набора для иммуноферментного анализа Human NOS3/eNOS (Nitric oxide synthase, endothelial) ELISA Kit cat. № EH0554.

Концентрацию стабильных метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов, NOx) в плазме крови определяли с помощью реактива Грисса [15].

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Statistica 10.0. Количественные данные, распределение которых не являлось нормальным, представлялись в виде медианы (Me), нижнего (Q25) и верхнего (Q75) квартилей. Для оценки различий количественных признаков применялись непараметрические методы статистического анализа. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При определении аргинина в плазме крови медиана уровня данной аминокислоты у пациентов группы 1 составила 78,26 (57,30; 90,55) мкмоль/л, в группе 2 – 71,61 (50,00; 89,48) мкмоль/л, среди здоровых детей – 65,48 (49,67; 77,88) мкмоль/л (рис. 1).

Установлено, что у детей с артериальной гипертензией уровень аргинина был статистически выше по сравнению со здоровыми детьми ($p=0,02$). Группа 1 и группа 2, как группа 2 и группа 3, по концентрации аргинина статистически не различались ($p>0,05$). Полагаем, что повышение содержания аргинина у детей с артериальной гипертензией в нашем исследовании можно объяснить наличием у них гипергомоцистеинемии, которая подавляет активность основного катализатора – eNOS, тем самым нарушает биодоступность аргинина для синтеза NO.

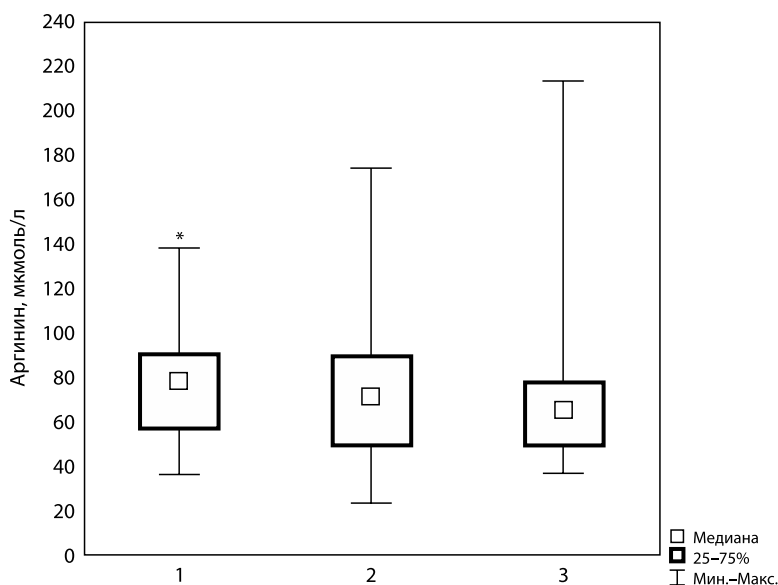


Рис. 1. Уровень аргинина в плазме крови обследованных детей

Примечание: * статистически значимые различия между группой 1 и группой 3 ($p=0,02$).

Fig. 1. Level of arginine in blood plasma of examined children

Note: * statistically significant differences between group 1 and group 3 ($p=0,02$).

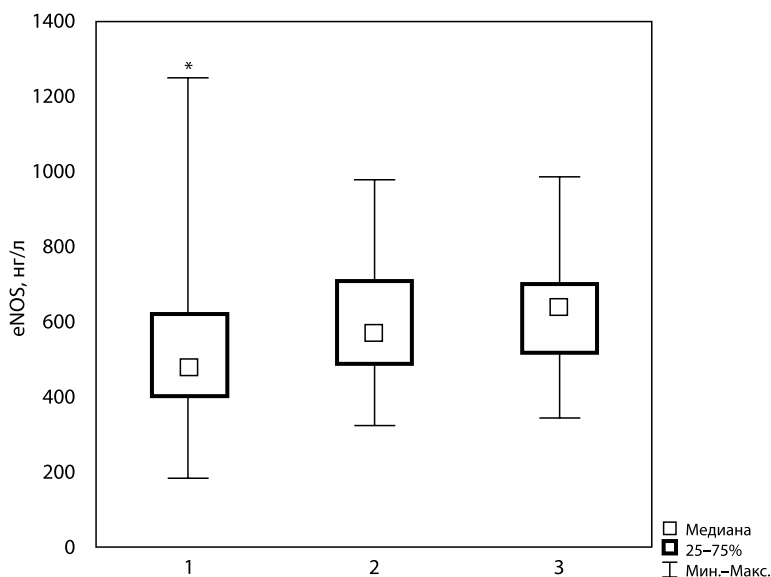


Рис. 2. Уровень eNOS в плазме крови обследованных детей

Примечание: * статистически значимые различия между группой 1 и группой 3 ($p=0,03$).

Fig. 2. Level of eNOS in blood plasma of examined children

Note: * statistically significant differences between group 1 and group 3 ($p=0.03$).

При определении активности eNOS в плазме крови установлено, что медиана eNOS у детей группы 1 составила 480,28 (400,0; 617,93) нг/л, в группе 2 – 569,79 (492,96; 709,39) нг/л, среди здоровых детей – 638,38 (516,89; 700,96) нг/л (рис. 2).

У детей с эссенциальной артериальной гипертензией уровень eNOS характеризовался более низкими значениями по сравнению с группой здоровых детей ($p=0,03$). Группа 1 и группа 2, как группа 2 и группа 3, по концентрации eNOS статистически не различались ($p>0,05$).

Уровень стабильных метаболитов оксида азота у детей с артериальной гипертензией составил 20,25 (16,87; 22,30) мкмоль/л, в группе детей с высоким нормальным артериальным давлением – 18,12 (15,62; 20,98) мкмоль/л, среди здоровых детей – 21,39 (18,03; 26,89) мкмоль/л (рис. 3). При сравнительном анализе содержания плазменного уровня NOx у пациентов в зависимости от сформированных групп установлены статистически значимые различия между группой здоровых детей и пациентами с артериальной гипертензией ($p=0,04$) и между группой сравнения и группой детей с высоким нормальным артериальным давлением ($p=0,004$). Достоверных различий между пациентами 1-й и 2-й группы выявлено не было.

Следует отметить, что среди обследованных детей с артериальной гипертензией и высоким нормальным артериальным давлением уровень NOx в плазме крови был достоверно ниже по сравнению с таковым в группе контроля, что может указывать

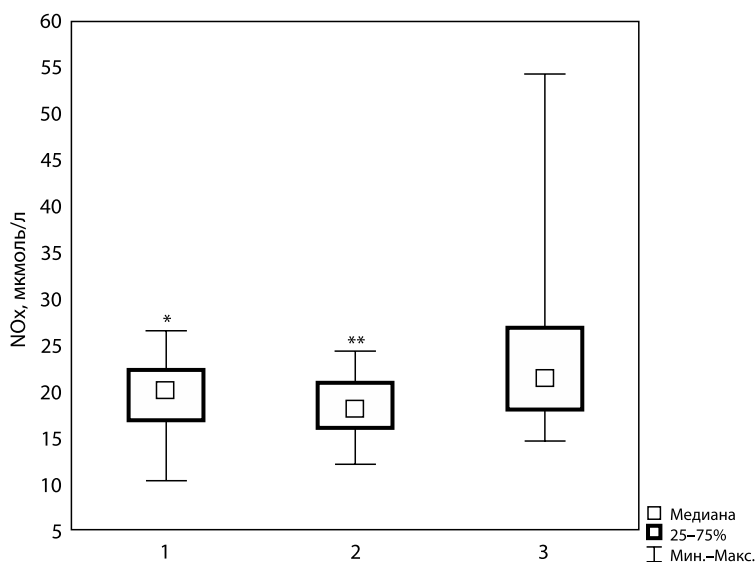


Рис. 3. Уровень стабильных метаболитов NO в плазме крови обследованных детей

Примечания: * статистически значимые различия между группой 1 и группой 3 ($p=0,04$); ** статистически значимые различия между группой 2 и группой 3 ($p=0,004$).

Fig. 3. Level of stable NO metabolites in blood plasma of examined children

Notes: * statistically significant differences between group 1 and group 3 ($p=0.04$); ** statistically significant differences between group 2 and group 3 ($p=0.004$).

на падение продукции эндотелиального NO и усугублять дисфункцию эндотелия. Полагаем, что эти изменения в метаболизме NO являются одним из главных механизмов формирования повышенного артериального давления у детей.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Группа детей с артериальной гипертензией характеризовалась повышенным уровнем аргинина в плазме крови по сравнению с таковым в группе сравнения.
2. Активность эндотелиальной синтазы оксида азота и уровень стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови у детей с артериальной гипертензией характеризовались более низкими значениями по сравнению с аналогичными значениями в группе здоровых детей, что может указывать на падение продукции эндотелиального NO.
3. У детей с артериальной гипертензией выявлены нарушения в системе L-аргинин-NO, характеризующиеся снижением синтеза NO вследствие низкой активности эндотелиальной синтазы оксида азота.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zhao Y., Vanhoutte P.M., Leung S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(2):83–94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002
2. Maltseva N.V., Smirnova A.S., Rublevskaya A.C., Bichan N.A. Possible genetically determined mechanisms of arterial hypertension in tobacco smoking. *Kardiologiia.* 2019;59(15):4–10. (in Russian)
3. Belovol A.N., Knyazkova I.I. Endothelial function: focus on nitric oxide. *Health of Ukraine.* 2012;50–51. (in Russian)
4. Kazak M.E., Zinchuk V.V., Gulyai I.E. Participation of the L-arginine-NO system in adaptive processes in chronic oxidative stress. *Military medicine.* 2014;4:77–78. (in Russian)
5. Sokolova L.K., Pushkarev V.M., Tronko M.D. L-arginine in norm and pathology. *Endocrinology.* 2019;24(4):373–386. (in Russian)
6. Morris S.M. Jr. Arginine metabolism revisited. *J Nutr.* 2016;146(12):2579S–86S. doi: 10.3945/jn.115.226621
7. Luksha A.V., Maximovich N.A. State of vasomotor function of the endothelium in children with arterial hypertension. *Pediatrics. Eastern Europe.* 2022;10(4):489–499. (in Russian)
8. Goncharov N.P. Nitric oxide (NO): physiology and metabolism (lecture). *Andrology and Genital Surgery.* 2020;21(3):75–79. doi: 10.17650/2070-9781-2020-21-3-75-79
9. Kuznetsova V.L., Soloveva A.G. Nitric oxide: properties, biological role, mechanisms of action. *Modern problems of science and education.* 2015;4:24–29. (in Russian)
10. Ghafourifar P., Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(4):190–195. doi: 10.1016/j.tips.2005.02.005
11. Luksha A.V., Maximovich N.A., Harchakova V.V., Gulyai I.E., Shulika V.R. Effect of the polymorphisms 894G/T and T786C of the endothelial nitric oxide synthase gene on the levels of their expression products – eNOS and NO in children with arterial hypertension. *Practical medicine.* 2022;20(7):46–50. (in Russian)
12. Vasina L.V., Petrishchev N.N., Vlasov T.D. Markers of endothelial dysfunction. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2017;16(1):4–15. (in Russian)
13. Gumanova N.G. Nitrogen oxide and its circulating NOx metabolites, their role in human body functioning and cardiovascular death risk prediction (Part II). *Profilakticheskaya Meditsina.* 2021;24(10):119–125. (in Russian)
14. Nefyodov L.I., Glazev A.A., Doroshenko E.M. Determination of the content of free amino acids and their derivatives by high performance liquid chromatography. *MVI. MN 3201-2009.* 2009;18. (in Russian)
15. Bryan N.S., Grisham M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:645–657.