

Ассиметричный диметиларгинин в качестве медиатора и маркера развития эндотелиальной дисфункции

А.А. Жлоба

Отдел биохимии НИЦ СПбГМУ им. И.П. Павлова

Резюме

Нарушение эндотелий – зависимой вазодилатации является одним из основных эффектов, возникающих при накоплении ассиметричного диметиларгинина (АДМА) и гомоцистеина в организме.

Повышенный уровень АДМА в плазме крови может формироваться при умеренной форме гипергомоцистеинемии (ГГци). В большинстве случаев торможение *eNOS* под влиянием гомоцистеина возникает за счет ассиметричного диметиларгинина (АДМА), накапливающегося в эндотелиоцитах. Механизм этого явления, по-видимому, состоит в том, что гомоцистеин в клетке превращается в S-аденозилгомоцистеин – мощный ингибитор диметиларгинин-диметиламиногидролазы (ДДАГ). Данные литературы указывают на то, что развитие эндотелиальной дисфункции может зависеть как от сочетания всех этих факторов, так и в отсутствие одного из них.

Ключевые слова: АДМА, гомоцистеин, эндотелиальная дисфункция.

ADMA as a marker and mediator of endothelial dysfunction progression

A.A. Zhloba

St.-Petersburg State I.P. Pavlov Medical University

Impaired endothelium-dependent vasodilatation is one of a main effects followed from elevation ADMA and homocysteine.

Homocysteine dependent inhibition of the enzymatic function of *eNOS* arises as associated event under the direct influence of **ADMA** elevation in endothelial cells. The cellular mechanism of this phenomenon, apparently, consists in transformation of homocysteine in S-adenosyl-homocysteine which inhibits dimethylarginine dimethylamino hydrolase (**DDAH**). The literature data show up dependence of endothelial vasomotor dysfunction development both from on a combination of these factors, and in case of one lack.

Key words: ADMA, homocysteine, endothelial dysfunction.

Статья поступила в редакцию: 01.06.07. и принята к печати: 08.06.07.

Вазомоторная эндотелиальная дисфункция, сопряженная с нарушением продукции оксида азота, представляет собой раннее проявление нарушения метаболизма эндотелиоцита, являющееся в дальнейшем важной составляющей в патогенезе артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, тромбоэмболических осложнений. При артериальной гипертензии в качестве важного фактора развития эндотелиальной дисфункции отмечают наличие непосредственно в цитозоле относительно дефицита аргинина в качестве субстрата эндотелиальной синтазы оксида азота [1]. Снижение эндотелий зависимой вазодилатации, связанной с этим сигнальным путем, отмечается также при прогрессировании атеросклероза [2]. Показано, что не только эссенциальная гипертензия, но и гипертензия при феохромоцитоме и альдостеронизме зависит от торможения функции эндотелиальной синтазы оксида азота [3]. Нарушение продукции оксида азота может возникать не только из-за дефицита аргинина в эндотелиоците, а также в связи с накоплением эндогенных конкурентных ингибиторов в клетке. Ослабление функции эндотелиальной **NO**-синтазы (*eNOS* или *NOS3*) в значительной степени

может быть связано с накоплением ингибиторов, являющихся метилированными производными аргинина. Среди низкомолекулярных метаболитов цитозоля эндотелиоцита, рассматриваемых в качестве сильного конкурентного ингибитора *eNOS*, приобрел широкую известность ассиметричный диметиларгинин (N^G, N^G -диметил-L-аргинин – АДМА). В то время как, N^G, N^G -диметил-L-аргинин (СДМА), или симметричный диметиларгинин, не является ингибитором *eNOS* [2, 4]. Строение метилированных производных аргинина показано ниже.

Нарушение эндотелий зависимой вазодилатации является одним из основных эффектов возникающих при накоплении АДМА и гомоцистеина в организме. Это зависит как от снижения генерации оксида азота в эндотелиоцитах, так и от ограничения его доступности для мышечной гуанилатциклазы. Первые сообщения о том, что именно АДМА, в отличие от других метилированных производных аргинина, является эндогенным ингибитором синтеза **NO** появились в 1992 [5–7]. Анализ методами протеомики показал, что метилирование основных аминокислот в белках, в том числе аргинина, является распространенным регуляторным биологическим

ким процессом. Метаболический процесс постсинтетического метилирования затрагивает модификацию разнообразных белков в ходе репарации, транскрипции, трансляции, в том числе в зависимости от гормональной регуляции состояния клетки [8].

Известно, что после инъекций АДМА возникает значительное повышение артериального давления [9]. В отличие от другого метаболита – гомоцистеина, сопровождающего эндотелиальную дисфункцию, генерация больших количеств АДМА в меньшей степени зависит от витаминов группы В. Повышенный уровень АДМА в плазме крови может формироваться при умеренной форме гипергомоцистеинемии (ГГци) [10]. Исследование воздействия разовой суточной дозы 50 мг витамина В1, 50 мг витамина В6, 0,05 мг витамина В12 и 5 мг фолиевой кислоты показало эффективность такого подхода при терапии промежуточной ГГци на протяжении 6 недельного периода. У больных с артериальной гипертензией старше 60 лет спустя 6 месяцев лечения уровень общего гомоцистеина снизился с $19,0 \pm 6,3$ до $12,5 \pm 4,2$ мкмоль/л, достоверность различий – $p < 0,05$ при сравнении с основным уровнем парным *t*-тестом; и так же $p < 0,05$ тестом ANOVA между группами, в то время как уровень АДМА сохранял высокое содержание от начала лечения – $0,59 \pm 0,12$ и в конце наблюдения $0,61 \pm 0,14$ мкмоль/л. В этом исследовании авторы обнаруживают, что уровень АДМА положительно коррелирует с уровнем С – реактивного белка ($r = 0,29$; $p < 0,01$). В большинстве случаев торможение *eNOS* под влиянием гомоцистеина связывают не с изменением количества эндотелиальной *NOS* за счет торможения экспрессии генов, а с ингибированием за счет ассиметричного диметиларгинина (АДМА), накапливающегося в эндотелиоцитах. Механизм этого явления, по-видимому, состоит в том, что гомоцистеин в клетке превращается в S-аденозилгомоцистеин – мощный ингибитор диметиларгинин-диметиламиногидролазы (ДДАГ) [11, 12]. Наряду с этим показано, что при ишемической болезни сердца гипергомоцистеинемия может быть несвязана с повышенным уровнем АДМА [13]. Развитие эндотелиальной дисфункции может зависеть как от сочетания этих факторов, так и только одного из них.

Данные по измерению метаболитов оксида азота в крови

После введения в кровь плечевой артерии здоровых субъектов примерно 36 мкмоль собственно оксида азота, последний в течение нескольких десятков секунд превращается в нитраты, нитриты и нитрозотиолы, повышая их количество в 30, в 4 и примерно в 2 раза соответственно. При этом, как отмечают авторы, в окислении оксида азота заметно меньшую роль играют эритроциты, чем реакции, происходящие собственно в плазме [14–16]. В плазме крови у здоровых доноров (9 мужчин и 9 женщин в возрасте 33 ± 2 лет) было обнаружено $14,4 \pm 1,7$ мкмоль/л нитратов, $0,2 \pm 0,02$ мкмоль/л нитритов, $7,2 \pm 1,1$ нмоль/л S-нитрозотиолов и $32,3 \pm 5,0$ нмоль/л N-нитрозотиолов [16]. Последние в плазме крови являются значительно более стабильными, по сравнению с S-нитрозотиолами, продуктами нитрозилирования белков. Для приготовления плазмы при заборе крови в данном случае были использованы 2,5 мМ ЭДТА

и 10 мМ N-этилmaleимид. S-нитрозотиолы белков способны образовываться за счет высших окислов азота [17] и свободных тиолов в форме тиолат-анионов, в особенности альбумина (Cys34-S⁻), и претерпевать декомпозицию в присутствии ионов переходных металлов [18]. Гемоглобин, церулоплазмин, супероксиддисмутаза и другие медьсодержащие белки могут способствовать как образованию, так и декомпозиции нитрозотиолов [19]. Определенный вклад в варьирование данных по анализу суммы окислов азота и нитрозотиолов могут также вносить S-нитрозотиолы гемоглобина в зависимости от концентрации кислорода [20]. Из-за указанных причин содержание нитрозотиолов после взятия крови и приготовления плазмы может изменяться в концентрациях от нескольких микромольей и выше [21]. Эта ситуация затрудняет интерпретацию получаемых данных как относительно варьирования в плазме крови самих нитрозотиолов, так и в отношении суммарного содержания продуктов **NO**-синтазных активностей. По-видимому, выявляемое содержание нитрозотиолов в образце плазмы крови может зависеть от исходного их уровня, аэрации пробы крови, окислительно-восстановительного состояния плазмы крови, абсолютного уровня тиоловых групп железо- и медь-содержащих белков. Изучение суммы продуктов **NOS** в плазме крови по содержанию суммы нитритов и нитратов в большинстве случаев обосновывали преимущественным накоплением нитратов в крови [22]. В данном исследовании показано, что суммарное содержание нитратов и нитритов составляло 35 ± 9 мкмоль/л у мужчин и женщин без повышенного артериального давления в среднем возрасте 48 ± 4 года. При повышении артериального давления в результате солевой диеты авторы наблюдали значительное снижение суммы окислов азота. По другим данным сумма нитритов и нитратов плазмы крови у доноров мужчин и женщин в возрасте около 60 лет может достигать 70–80 мкмоль/л, а у гипертоников более 100 мкмоль/л. [23]. У здоровых доноров в возрасте 38 ± 9 лет сумма нитратов и нитритов, выявленная еще одной группой исследователей аналогичным методом с использованием реакции Грисса составила 27 ± 8 мкмоль/л [24]. В этом же исследовании показано, что у молодых гипертоников содержание общего гомоцистеина (oГци, tHcy) было почти в два раза выше, чем у здоровых доноров, а содержание окислов азота у гипертоников различных групп в возрасте около 35 лет в среднем было достоверно выше.

Данные, полученные к настоящему времени, позволяют предположить, что включение в анализ суммарного содержания продуктов **NOS** наряду с нитратами и нитритами S-нитрозотиолов (**NOX**) более полно отражает образование и выведение продуктов превращения оксида азота в организме. Большое внимание последнее время начали уделять нитрозотиолам в качестве обратимо депонированной формы оксида азота, а также в связи с поиском лабораторного клиничко-диагностического критерия состояния **NO**-синтазной активности в качестве одного из показателей эндотелиальной дисфункции.

Известно, что промежуточные ГГци характерны для лиц с прогрессирующими эндотелиальными дисфункциями и атерогенезом [25]. Гомоцистеин (Гци), как и оксид азота, способен приводить к модификации серы белков, в частности, альбумина [26, 27]. В результате

проведенных нами совместно с кафедрой факультетской терапии исследований показано, что у пациентов с перенесенным в относительно молодом возрасте инфарктом наблюдается снижение циркулирующих в крови продуктов **NOX** при повышении уровня оГци (Рис 1). У этих пациентов при более высоких значениях **NOX** одновременно наблюдается более высокий уровень эндотелий-зависимой вазодилатации. Интересно отметить, что по полученным данным суммарное содержание **NOX** у доноров старшей группы значительно выше, чем у здоровых субъектов в возрасте 23–24 лет. Не исключено, что в старших возрастных группах для обеспечения регуляции **NO**-зависимых функций требуется более высокий уровень активности **eNOS**, чем в молодом возрасте.

Анализ оГци нашел широкое применение в клинической биохимии [25]. В отличие от этого, анализ продуктов активности **eNOS** в лабораторно-диагностической практике настолько широко не используется. Исследования этих продуктов в зависимости от состояния эндотелия представлены весьма широко [28–32].

Оксид азота в качестве модулятора мышечных гуанилатциклаз требуется в концентрациях от нескольких десятков наномолей до 0,1 мкмоль/л [29]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что для активации мишеней не требуется концентрация оксида азота или его депонированных форм более 100–250 нмоль/л [30]. При анализе суммы продуктов **NO**-синтазной активности в плазме крови обнаружено, что их количество в десятки и сотни раз выше.

Прямое измерение концентрации **NO** в среде культивируемых эндотелиоцитов электрохимическим методом свидетельствует о том, что повышение концентрации оГци выше 20 мкмоль/л происходит снижение активности **eNOS** без какого-либо влияния на ее экспрессию [31].

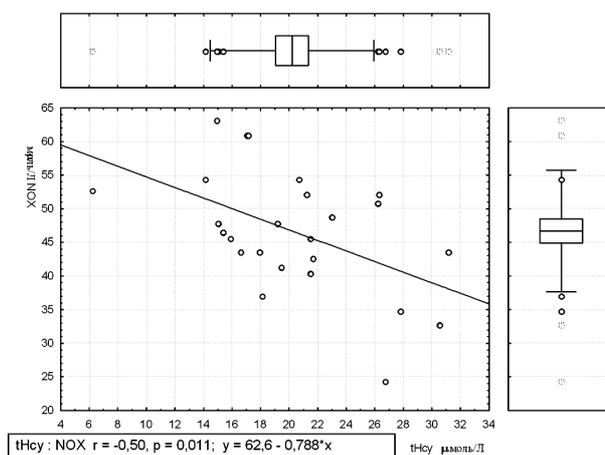
По-видимому, на определенном (позднем) этапе развития эссенциальной артериальной гипертензии при отсутствии воспалительных процессов, уровень продуцируемого в организме оксида азота может снижаться [32]. Одной из вероятных причин снижения содержания **NOX** в системном кровотоке при ГГци считают торможение активности **e-NOS**, в том числе при нарушении свободнорадикального и окислительно-восстановительного равновесия [33].

Не следует останавливаться на объяснении снижения концентрации продуктов **NO**-синтаз только за счет снижения их образования при ограниченной доступности аргинина. Необходимо учитывать возможность увеличения скорости их выведения. Возможно, что при образовании низкомолекулярных нитрозотиолов, в том числе гомоцистеина, наблюдается уменьшение их доли связывания с белками и, соответственно, более высокая экскреция, т.к. низкомолекулярный нитрозотиол гомоцистеина не имеет препятствий для клубочковой фильтрации в отличие от гомоцистеинилированных белков.

Данные по анализу нитрозотиолов вызвали обширную дискуссию в среде клинических биохимиков. Какова истинная концентрация нитрозотиолов в плазме крови – это десятки наномоль/л, микромоль/л или десятки мкмоль/л? Источником дополнительных количеств любого из оксидов азота могут быть связанные с гемоглобином эритроцитов запасы **NO**. Наряду с этим

справедливо указано на то, что для анализа нитрозотиолов не следует применять агенты, блокирующие эндогенные тиолы, так как последние препятствуют их спонтанной декомпозиции и окислению [15]. Показано, что уровень **NOX** в старшей возрастной группе здоровых субъектов и у больных перенесших инфаркт, получавших гиполипидемическую терапию в течение 3 месяцев, значительно превышает их уровень у здоровых доноров. При анализе содержания высших оксидов азота плазмы в сумме с **S** – нитрозотиолами, выявлена их отрицательная корреляционная взаимосвязь с величиной оГци, при колебаниях последнего от 15 до 30 мкмоль/л (Рис. 1).

Рис. 1. Снижение уровня **NOX** при возрастании содержания тHcy в плазме крови 25 пациентов с перенесенным 3 месяца назад инфарктом в возрасте от 45 до 59 лет, $49,5 \pm 6,4$ ($N=25$), [60].

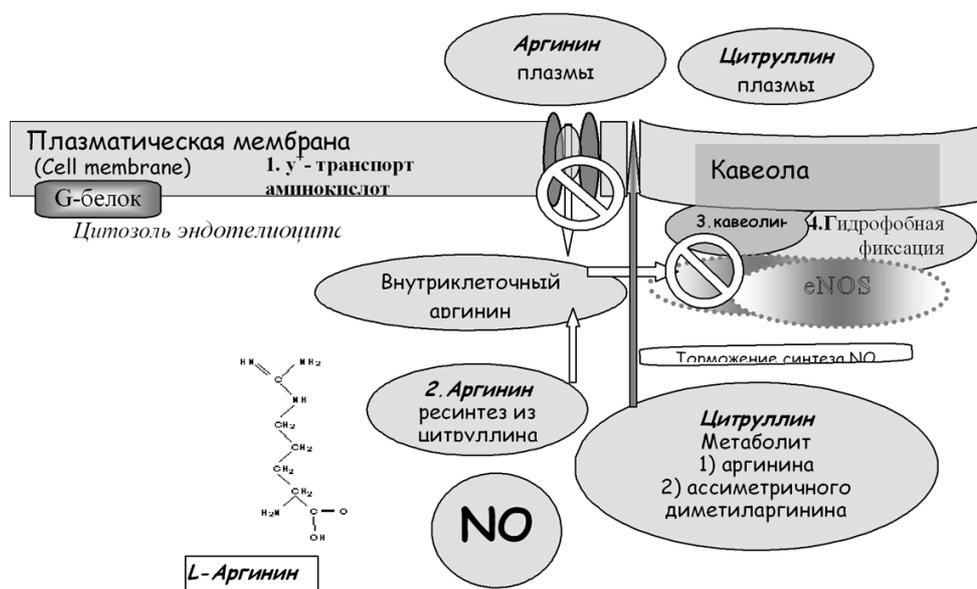


В опытах по введению больших количеств нитрозотиола глутатиона экспериментальным крысам было выявлено повышение МДА и снижение тиоловых групп в плазме крови через 30 мин и час после введения препарата нитрозоглутатиона [34]. По-видимому, увеличение концентрации циркулирующих продуктов **NO**-синтаз может вносить вклад в повышение образования продуктов ПОЛ. Оценку неблагоприятных эффектов терапии донорами оксида азота следует проводить с использованием тестов оксидативного и нитрозилирующего стрессов. Уровень **NOX**, поддерживаемый в организме на возможно более низком, но достаточном для активации своих мишеней уровне, является желательным при проведении терапии с применением доноров **NO**. Для этих целей может быть использована методика оценки суммарного содержания продуктов активности **NO**-синтаз в виде **NOX**.

Регуляция активности **e-NOS** в норме и в ходе развития вазомоторной эндотелиальной дисфункции

Накопление АДМА и гомоцистеина при патологических состояниях оказывают дополнительное ингибирующее влияние на продукцию оксида азота в эндотелиоцитах. В обычных условиях активность **eNOS** сильно зависит от уровня кальция в цитозоле в окрестностях кавеол. Эндотелиальная **NO**-синтаза после синтеза

Рис.2. Фиксированная на внутренней мембране кавеол форма эндотелиальной синтазы оксида азота.



Снижение доступности аргинина в качестве субстрата за счет:

- 1) ограничения транспорта из плазмы крови,
- 2) недостаточного ресинтеза аргинина из цитруллина, образующегося в клетке,
- 3) фиксации энзима кавеוליном,
- 4) гидрофобной сорбции энзима при помощи ацильных остатков миристиновой и пальмитиновой жирных кислот,
- 5) в условиях дефицита ионов кальция в области кавеол эндотелиоцита.

de novo сосредоточена главным образом в области кавеол (Рис. 2), плазмалемных бокаловидных углублений эндотелиоцита, имеющих диаметр примерно 50–100 нм. Кавеолы эндотелиоцита возникают благодаря включению в состав плазматической мембраны белка кавеолина (caveolin-1) [35]. Кавеолин 1 содержится не только в эндотелиоцитах, но и в большинстве других клеток в отличие от белка кавеолина 2, который обнаруживается в адипоцитах. Мышечная ткань, в том числе и сердечная, не содержит в составе кавеол белок кавеолин 3 [36]. Последний не только придает мембране характерную форму, но и обладает способностью связывать **NO**-синтазу. Энзим, фиксированный кавеוליном и соответственно мембраной, не проявляет активности, так как субстрат не доступен активному центру (Рис. 2). Кавеолы отличаются от соседних участков плазматической мембраны тем, что в ее составе больше холестерина, полиненасыщенных жирных кислот и сфингомиелина [35]. Эта часть поверхности эндотелиоцита отличается также большим содержанием рецепторных белков, таких как рецепторы опосредованные **G**-белком, ацетилхолиновые, брадикининовые, эстрогенные или рецепторами эндотелиального фактора роста сосудов (**VEGF**). Механический сдвиг поверхности мембраны в области кавеол при ламинарном потоке крови также вызывает активацию **eNOS** [37].

Гидрофобная фиксация за счет ацильных остатков пальмитата и миристилата дополнительно снижает биодоступность **eNOS** [38–40].

Стресс из-за сдвига клеточной мембраны (shear stress, англ.). Стресс напряжения (сдвига) в качестве биологического понятия возникло позже понятия на-

пряжения поверхности в физике. Напряжение сдвига мембраны кавеол является механическим источником развития определенного сигнального пути, подобного рецепции с развитием внутриклеточных событий. Мембранный стресс может затронуть автономную регуляцию продукции оксида азота в эндотелиоците. Гемодинамические силы, которые возникают в ходе перемещения крови вдоль стенки сосуда, включают 2 компонента: 1) силы, формирующие стресс напряжения (shear stress), направленные тангенциально, т.е. по касательной к поверхности сосуда, когда поток крови смещается вдоль поверхности и 2) давление, сила которого направлена перпендикулярно стенке сосуда [41]. Первый вид из вышеуказанных сил, формирующих стресс напряжения поверхности, вызывает активацию синтеза оксида азота [24, 42]. Сила возникающая при стрессе напряжения в крупных артериях составляет от 1 до 20 дин/см². В местах бифуркаций и изгибов сосуда эта сила может достигать 100 дин/см². При этом очень быстро, от миллисекунд до секунды, в ответ на возникающее напряжение мембраны наблюдается изменение ее ионной проводимости [43].

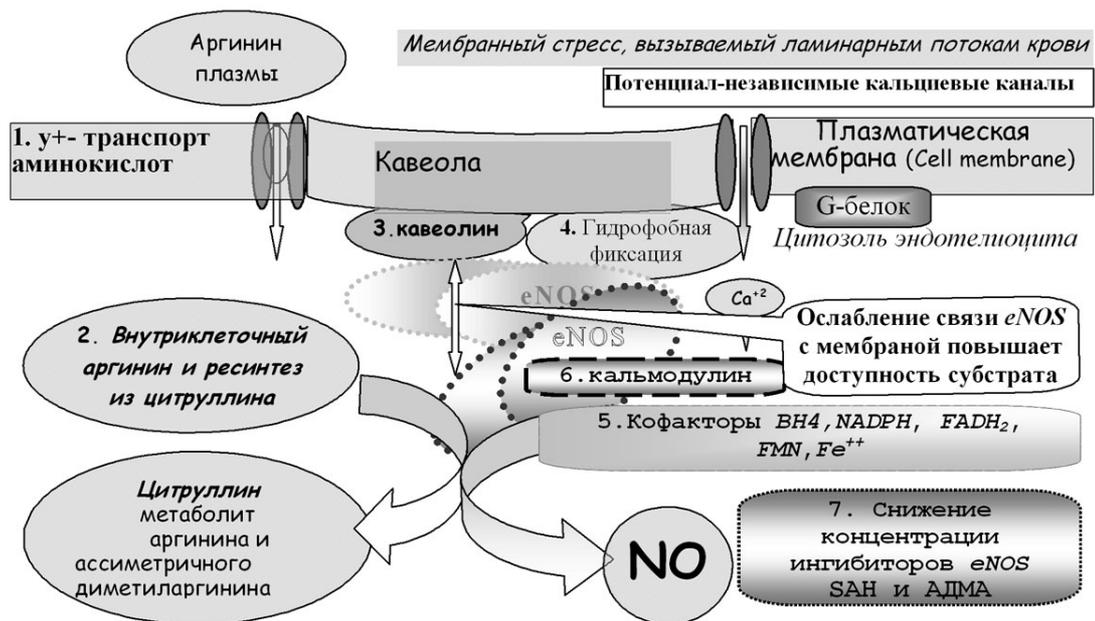
Механические напряжения в мембране могут вызывать значительные нарушения в ее структурах, дисординацию функционирования рецепторных, транспортных белков и усиление окисления ПНЖК (перекисное окисление липидов). Нарушения толерантности поверхности, например, эндотелия сосудов к механическому сдвигу, могут зависеть от нарушения метаболизма в эндотелиоцитах в целом. Снижение эластичности мембран может быть зарегистрировано неинвазивным методом, базирующимся на динамической доплерографии сосуда [44]. В результате напряжения поверхности эн-

дотелия происходит дальнейшее разобщение процессов гормональной регуляции, усиление альтернативного пути транспорта липидов в медиальный слой сосудистой стенки, усиление адгезии тромбоцитов и моноцитов с их последующим участием в ремоделировании сосудистой стенки. Стресс (напряжение) мембраны играет значительную регуляторную роль и одновременно вносит свой вклад в развитие эндотелиальной дисфункции при патологических состояниях.

В качестве одного из значимых ответов мембраны на стресс рассматривают изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и фосфорилирование молекулы субъединицы *eNOS* по остатку серина в положении 1179 [45, 46]. Транслокация *eNOS* не зависит от фосфорилирования молекулы фермента. Ослабление связи энзима с мембраной зависит от поступления иона кальция. Можно предположить существование одного из двух механизмов ответственных за повышение количества внутриклеточного иона кальция при стрессе напряжения мембраны. Это либо активация неселективных механочувствительных ионных каналов, либо потокозависимое побуждение к выходу АТФ за пределы клетки с последующей активацией поверхностных пуринорецепторов с высвобождением Ca^{2+} . По-видимому, мембранный стресс в норме не зависит от выхода к поверхности клетки АТФ, т.к. в большей степени зависит от изменения функционирования плазмалемных каналов Ca^{2+} [47]. В норме описанный выше вид мембранного стресса полностью связан с тангенциальными силами ламинарного потока крови и вы-

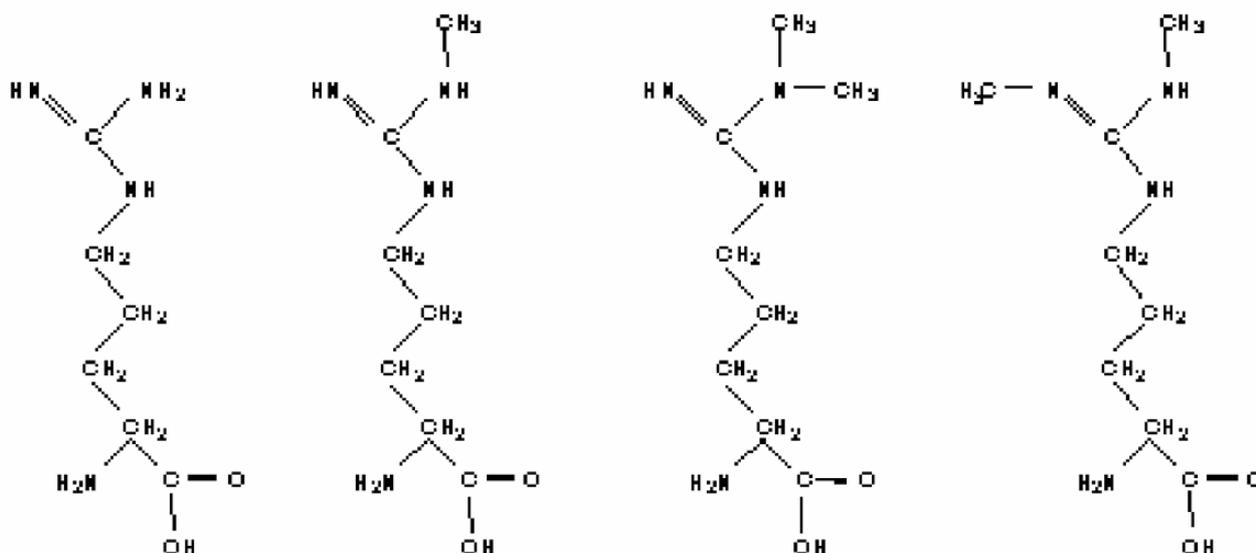
зывает в ответ на напряжение посредством увеличения внутриклеточного Ca^{2+} кальмодулин-зависимую активацию синтеза оксида азота за счет эндотелиальной *eNOS*. Правильнее считать, что эта цепочка событий может быть реализована в повышении синтеза в кавеолах эндотелиоцитов оксида азота из аргинина при соответствующей готовности самой эндотелиальной *NOS*. Ряд внутриклеточных устойчивых состояний метаболизма может в существенной мере влиять на активацию связанной с внутренней поверхностью мембраны в кавеолах эндотелиоцита *eNOS*. В связанном положении энзим не активен, т.к. не ориентирован по отношению к потокам субстрата – аргинина и зависит, кроме того, от Ca^{2+} -кальмодулина и от наличия коферментов, включая восстановленные *NADP*, биоиптерин, ФАД и флаavin мононуклеотид. В кавеолах эндотелиоцитов *eNOS* характеризуется тремя видами фиксации к мембране: 1) за счет сродства мембранного белка кавеолина, 2) за счет остатков миристиновой кислоты, которые имеет каждая из субъединиц *eNOS*, 3) и за счет остатков пальмитиновой кислоты, которая возникла в составе энзима при обратимой постсинтетической его модификации. Тиоэстеразы способны катализировать отщепление пальмитата путем гидролиза. Пальмитат и миристилат, будучи гидрофобными, удерживаются внутренним слоем мембран кавеол особенно эффективно, т.к. последние богаты холестерином и сфинголипидами. Для дальнейшей активации *eNOS* необходимы ионы кальция, в присутствии которых наблюдается ее активация путем сборки в гомодимер [48] (Рис. 3).

Рис. 3. Активная форма эндотелиальной синтазы оксида азота дополнительно регулируется путем:



- 1) активации мембранного u^{+} - транспорта аргинина из плазмы крови,
- 2) ресинтеза аргинина из цитруллина, образующегося в клетке,
- 3) ослабления фиксации энзима кавеолином за счет повышения в цитозоле концентрации ионов кальция,
- 4) ослабления гидрофобной сорбции энзима из-за отщепления в тиоэстеразной реакции ацильных остатков пальмитиновой жирной кислоты от *eNOS*,
- 5) поддержания пула кофакторов *NO*-синтазной реакции: тетрагидрибиоиптерина (*BH4*), *NADPH*, *FADH₂*, *FMN*, *Fe⁺⁺*,
- 6) повышения концентрации ионов кальция в области кавеол эндотелиоцита вызывает сближение редуктазного и оксигеназного доменов *eNOS*,
- 7) поддержания низкой концентрации эндогенного конкурентного ингибитора *NOS* (АДМА) и различных форм внутриклеточного гомоцистеина, в том числе *S*-аденозилгомоцистеина (SAH).

Рис 4. Строение слева направо аргинина, монометиларгинина, симметричного диметиларгинина, ассиметричного диметиларгинина (заимствован из работы [59]).

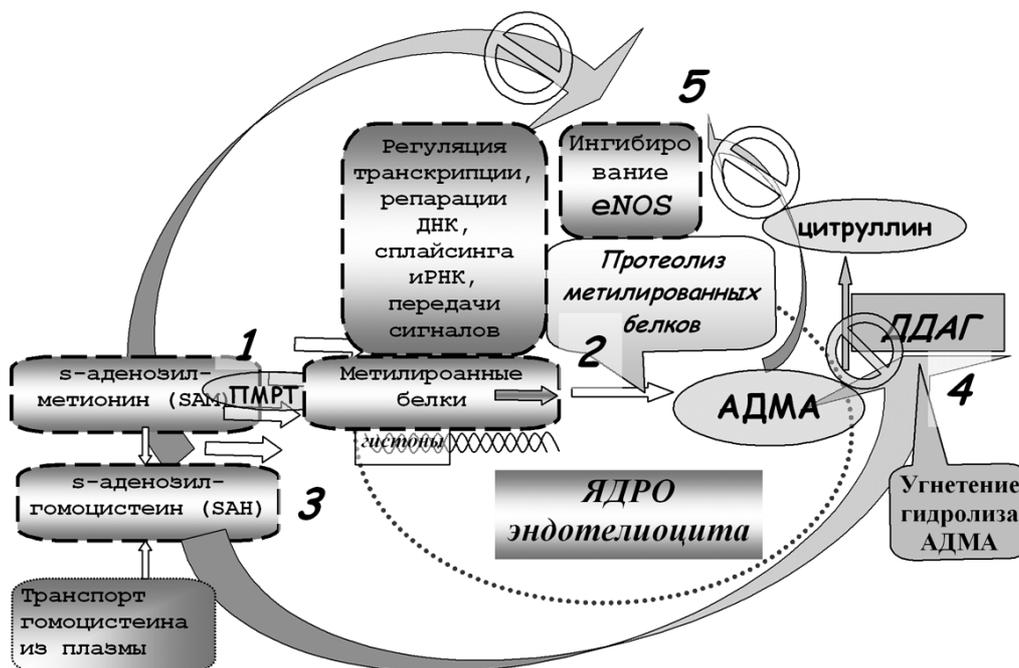


Ограничение активности eNOS путем конкуренции и снижения доступности субстрата. Активированная путем самосборки *eNOS* в присутствии комплекса кальций – кальмодулин частично утрачивает свою каталитическую функцию при ограниченном поступлении аргинина. При недостатке аргинина *eNOS* функционирует не как синтаза оксида азота, а как катализатор генерации супероксиданиона и затем перекиси водорода за счет активации кислорода. Субстрат *eNOS* аргинин поступает в основном за счет особой системы транспорта из плазмы крови или путем ресинтеза из цитруллина. Последний в эндотелиоцитах может возникать не только в качестве продукта *NO*-синтазной реакции. Очень важным внутриклеточным источником цитруллина яв-

ляется продукт деградации внутриклеточных белков АДМА (его строение и строение других производных аргинина см на рис. 4).

Нарушение метаболизма аргинина в эндотелиоците (рис. 5) может заключаться в повышении внутриклеточной концентрации ассиметричного диметиларгинина (АДМА), который образуется в результате предшествующего протеолиза метилированных белков (реакции 1 и 2 на рис. 5). Метилирование белков – это постсинтетический процесс их модификации, который постоянно происходит за счет активированной формы метионина (*S*-аденозил-метионина, *SAM*), и нужен для важнейших реакций гормональной регуляции, репара-

Рис. 5. Ингибирующие эффекты метаболитов гомоцистеина и аргинина в эндотелиоците приводят к торможению активности эндотелиальной NOS. Пояснения сделаны в тексте.



ции генома в ходе транскрипции и трансляции. Для этого преимущественно в ядре клетки имеются энзимы – протеин-метилтрансферазы (ПМРТ, реакция 1 на рис. 5). Разрушение метилированных регуляторных белков путем протеолиза приводит к высвобождению различных аминокислот и АДМА (реакция 2 на рис. 5). Усиление этого процесса в ходе обновления белков в норме не ведет к повышению концентрации АДМА, т.к. происходит гидролиз АДМА до цитруллина и диметиламина в реакции, контролируемой диметиларгинин-диметиламино гидролазой. Можно попытаться устранить негативное влияние АДМА на снижение сродства субстрата к энзиму введением в организм повышенных доз препарата **L**-аргинина.

Уровень АДМА в плазме крови обычно составляет не более 0,6 мкмоль/л. У пациентов со стабильной стенокардией этот показатель может превышать 0,61 мкмоль/л, а у больных с тяжелой почечной недостаточностью, которые получают лечение гемодиализом, содержание АДМА в крови достигает 3,85 мкмоль/л и более [49].

В том случае, если в эндотелиоците накапливается большое количество гомоцистеина за счет внутренних источников и плазмы крови, наблюдается увеличение количества *S*-аденозил-гомоцистеина (**SAH**, реакция 3 на рис. 5), который является ингибитором ДДАГ (реакция 4 на рис. 3). Ингибирование ДДАГ ведет к повышению концентрации АДМА и торможению **eNOS** (реакция 5 на рис. 5). Снижение активности ДДАГ может наблюдаться при наследственных дефектах данного энзима. Кроме того, при повышении в клетке уровня гомоцистеина он также может оказывать прямое и косвенное угнетающее действие на **NO**-синтазную реакцию и доступность продукта в виде оксида азота гуанилатциклазам гладкомышечных клеток. Это происходит путем образования прочных смешанных дисульфидов Гци с различными тиолами, что препятствует образованию других нитрозотиолов помимо нитрозотиолов гомоцистеина. Нитрозотиолы цистеина, глутатиона, некоторых белков могут рассматриваться в качестве транспортной формы оксида азота [50]. Наряду с влияниями со стороны нарушений метаболизма АДМА и гомоцистеина на уровень продукции **NO** следует придавать большое значение влияниям полиморфизма гена самой **eNOS**. Сведения о существующих генетических полиморфизмах **eNOS** рассмотрены в ряде работ [51–54]. Эти и другие данные свидетельствуют о большой роли генетических полиморфизмов **eNOS** в предопределении развития эндотелиальной дисфункции.

Как известно, аргинин является аминокислотой, используемой не только для синтеза **NO**. Основными потребителями аргинина являются процесс генетически-детерминированного синтеза белка и реакции синтеза мочевины в печени. В условиях обычного питания и отсутствия нарушений мембранного транспорта уровень аргинина в крови не является лимитирующим фактором для суммарной активности **NOS**. Излишки аргинина метаболизируются в почках и печени. Для обеспечения быстрой адекватной регуляции **NO**-зависимых функций требуется постоянный транспорт субстрата **NOS** в клетку. На фоне снижения эф-

фективности транспортной системы (преимущественно так называемой системы y^+ – переносчиков основных аминокислот) активность **NOS** может быть повышена за счет увеличения содержания аргинина в плазме крови. Повышение уровня оГци в крови может приводить к некоторому росту концентрации аргинина в плазме крови. Тенденция к возрастанию концентраций гомоцистеина и аргинина одновременно может наблюдаться в случаях системного (распространенного) торможения каталитической функции **eNOS** и других **NO**-синтаз. Этот эффект может быть связан с накоплением в клетке АДМА и с некоторым торможением утилизации аргинина в **NO**-синтазных реакциях при гипергомоцистеинемии.

Таким образом, вазомоторная эндотелиальная дисфункция может зависеть от мутаций апфермента и от нарушения многозвеньевой системы активации-инактивации **eNOS**. Большое значение в развитии дисфункции **eNOS** имеет нарушение проницаемости кальциевых каналов в ответ на изменение скорости потока крови вдоль мембраны эндотелиоцита [55]. Отсутствие адекватной продукции оксида азота может зависеть от нарушения кальций-зависимой десорбции и сборки гомодимера энзима **eNOS** в области кавеол, ограничения доступности субстрата и кофакторов. При патологических состояниях, сопровождающихся артериальной гипертензией, торможение активности **eNOS** дополнительно усиливается накоплением эндогенных ингибиторов, производных аргинина и за счет связывания готового продукта – оксида азота гомоцистеином с образованием его нитрозотиола и окислением последнего до высших окислов азота. Важно отметить, что уровень АДМА у гипертоников с ожирением выше, чем у пациентов с нормальным весом. При снижении веса у больных АГ на фоне терапии препаратом из группы тиазолидинолона наблюдается значительное снижение уровня АДМА в крови от $1,69 \pm 0,44$ до $1,20 \pm 0,22$ мкмоль/л ($P < 0,001$) [56]. В данном исследовании отмечен также более высокий уровень АДМА у пациентов с инсулинорезистентностью ($1,69 + 0,44$ мкмоль/л) по сравнению с пациентами, имевшими ожирение, но являвшимися инсулин-чувствительными ($1,18 + 0,45$ мкмоль/л). Авторы наблюдали статистически значимое снижение уровня АДМА от $1,69 \pm 0,44$ vs. $1,18 \pm 0,45$ мкмоль/л до $1,20 \pm 0,22$ мкмоль/л ($P < 0,001$). Обращает внимание на себя высокое значение уровня АДМА крови у обследованных как до лечения, так и после курса лечения всех групп наблюдавшихся пациентов.

Известно, что метилированные производные аргинина, включая АДМА, после попадания в кровь из эндотелиоцитов возвращаются в другие ткани, включая почки [57]. Поэтому в почках и других тканях происходит метаболизмом АДМА с промежуточным образованием цитруллина. За счет быстрого превращения АДМА в цитруллин поддерживается низкий уровень АДМА в плазме крови. В плазме крови здоровых доноров его содержание не превышает 0,6 мкмоль/л. Следует также учитывать, что небольшое повышение АДМА в плазме крови может не отражать значительное повышение данного метаболита непосредственно в эндотелиоцитах. Накопление этого про-

дукта метаболизма зависит также от активного переноса через мембраны клеток, что может объяснять задержку АДМА в клетке [58]. Можно сделать заключение о том, что в качестве существенного молекулярного фактора в патогенезе артериальной гипертензии велика роль АДМА. Этот метаболит аргинина постоянно образуется в тканях из пула метилированных белков. Нарушение его утилизации и выведения не является редким нарушением метаболизма. По-видимому, коррекция уровня АДМА в крови и соответственно в тканях является более трудной терапевтической проблемой, нежели коррекция уровня общего гомоцистеина. Значение же определения АДМА в плазме крови для лабораторной диагностики в качестве маркера развития эндотелиальной дисфункции также велико.

Литература

- Gokce, N. L-Arginine and Hypertension// *J. Nutr.*- 2004.- V 134.- P 2807S–2811S.
- Perticone F., Sciacqua A., Maio R., et al. Endothelial dysfunction and the kidney: emerging risk factors for renal insufficiency and cardiovascular outcomes in essential hypertension *J Am Coll Cardiol.*- 2005.- V 46.- P 518–523.
- Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, et al. Endothelial Dysfunction in Hypertension Is Independent From the Etiology and From Vascular Structure// *Hypertension.*- 1998.- 31.- P. 335–341.
- Osanaï S. M., Matsunaga T. K. T., Ishizaka T., et al. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level// *Heart Vessels.*-2003.-V 18.-P 177–82.
- Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure// *Lancet.*- 1992.- V 339.- P 572–575.
- Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis// *J Cardiovasc Pharmacol.*- 1992.- V 20 (suppl 12).- P S60–S62.
- Teerlink T. Measurement of asymmetric dimethylarginine in plasma: methodological considerations and clinical relevance// *Clin Chem Lab Med.*- 2005.- 43.- P.1130–1138.
- Boisvert F.-M., Côté J., Boulanger M.-C., and Richard S. A proteomic analysis of arginine methylated protein complexes// *Mol Cell Proteomics.* - 2003.- V 2.- P 1319–1330.
- Achan V., Broadhead M., Malaki M., Whitley G., et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*- 2003.- V 23.- P 1455–1459.
- Ziegler S., Mittermayer F, Plank C, et al. Homocysteine-lowering therapy does not affect plasma ADMA concentrations in patients with peripheral artery disease // *J Clin Endocrinol Metab.*- 2005.- V 90.- № 4.- P 2175–2178.
- Cooke J. P., Asymmetrical dimethylarginine. The fiber marker?// *Circulation.*- 2004.-V 109.-P 1813–1819.
- Dayal S., Lentz S.R. ADMA and hyperhomocysteinemia// *Vascular Medicine.*-2005.-V. 10.- P S27–33.
- Jonasson T.F., Hedner T., Hultberg B., Ohlin H. Hyperhomocysteinemia is not associated with increased levels of asymmetric dimethylarginine in patients with ischaemic heart disease// *Eur J Clin Invest.*- 2003.- V 33.-P 543–549.
- Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds// *Proc Natl Acad Sci U S A.*- 1992.- V 89.- P. 444–448.
- Stamler J. S. S-nitrosothiols in the blood roles, amounts, and methods of analysis// *Circ. Res.*- 2004.- V 94.-P 414–417.
- Rassaf T. Preik M., Kleinbongard P. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma // *J. Clin. Invest.* 2002.-V 109.-P 1241–1248.
- Tsuchiya K., Kanematsu Y., Yoshizumi M., et al. Nitrite is an alternative source of NO in vivo // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*- 2005.-V 288.-P H2163–H2170.
- Al-Sa'doni H., Ferro A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs// *Clinical Science.*-2000.- V 98.-P 507–520.
- Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., et al. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications// *Am J Physiol Lung Cell Mol Physio.*- 2004.- V 287.-P L262–L268.
- Singel D. J., Stamler J. S. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and s-nitrosohemoglobin// *Annual Review of Physiology.*- 2005.- V 67.- P 99–145.
- Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., et al. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin// *Proc Natl Acad Sci U S A.*- 1992.- V 89(16).- P 7674–7677.
- Fujiwara N., Osanaï T., Kamada T., et al. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension. Modulation of nitric oxide synthesis by salt intake// *Circulation.*- 2000.-V 10. P856–861.
- Yoon Y., Song J., Hong S. H., Kim J. Q. Plasma Nitric Oxide Concentrations and Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Coronary Artery Disease// *Clin Chem.*- 2000.- V 46.- №10.- P 1626–1630.
- Hishikawa K. T., Nakaki T., Suzuki H., et al. Transmural pressure inhibits nitric oxide release from human endothelium cells. *Eur J Pharmacol.*- 1992.- V 215.- P 329–331.
- Refsum H., Smith A.D., Ueland P.M. et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion // *Clin. Chem.* - 2004.- V 50, №1.- P 3–32.
- Hankey G.J, Eikelboom J.W. Homocysteine and vascular disease// *Lancet.*- 1999.- V 13.-P. 354–407.
- Lim A., Sengupta S., McComb M. E., et al. In Vitro and in Vivo Interactions of Homocysteine with Human Plasma Transthyretin // *J. Biol. Chem.*- V 278(50).-P 49707–49713.
- Jungersten L, Ambring A, Wall B, et al. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans// *J Appl Physiol.*- 1997.-V 82.-P760–764.
- Condorelli P., George S. C. In Vivo Control of Soluble Guanylate Cyclase Activation by Nitric Oxide: A Kinetic Analysis// *Biophysical Journal.*- 2001.-V 80.-P 2110–2119.
- Stone, J. R., and M. A. Marletta. Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide// *Biochemistry.*- 1996.- V 35.-P 1093–1099.
- Zhang X, Li H, Jin H, et al. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production// *Am J Physiol Renal Physiol.*- 2000.- V 279.-P F671–F678.
- Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, et al. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension// *Hypertension.*- 1997.-V 30.-P 405–408.
- Endemann D. H., Schiffrin E. L. Endothelial Dysfunction// *J Am Soc Nephrol.*- 2004.- V 15.- P. 1983–1992.
- Каминская Л. Ю, Жлоба А.А., Александрова Л.А., Моисеева О.М. Моисеева О.М., Эмануэль В.Л., Шляхто Е.В. Влияние донатора NO нитрозотиола глутатиона на уровень окислов азота и малонового диальдегида в крови крыс // *Артериальная гипертензия.*- 2005.- V 11.- №1.- P 5–9.
- Shaul, P. W. Anderson, R. G. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction// *Am. J. Physiol.*- 1998.-V 275 P L843–L851.
- Way M., Parton R. G. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein// *FEBS Lett.* 1995.- V 376.- P108–112.
- Davies P. F., Polacek D.C, Shi C., Helmke B. P. The convergence of haemodynamics, genomics, and endothelial structure in studies of the focal origin of atherosclerosis// *Biorheology.*- 2002.- V. 39.- P. 299–306.

38. Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme// *Biochemistry*.- 1995.- 34.- P. 12333–12340.
39. Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization// *Biochemistry*.- 1996.-V 35.- P.13277–13281.
40. Liu J., Sessa W. C. Identification of covalently bound amino-terminal myristic acid in endothelial nitric oxide synthase// *J Biol Chem*. 1994.-V. 269.- №16.- P.11691–11694.
41. Osanai T., Saitoh M., Sasaki S., et al. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells// *Hypertension*.- 2003.-42.- P. 985–990.
42. Rubanyi G. M., Freay A. D., Kauser K., et al. Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure – and flow-induced vascular responses// *Blood Vessels*. 1990.-27.- P 246–257.
43. Lansman JB, Hallam TJ, Rink TJ. Single stretch-activated ion channel in vascular endothelial cells as mechanotransducers?// *Nature*.- 1987.- V 325.- P 811–813.
44. Vanauker M. D., Tacy T. A., Nido P. J-d.2 and Cape E. G. Development of a Noninvasive Marker of Wall Shear Stress Effects in Discrete Subaortic Stenosis// *Cardiovascular Engineering* .- 2001.-V 1.- № 3 .- 137–146.
45. Shen J., Lusinskas F. W., Connolly A., et al. Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells// *Am J Physiol*.- 1992.- V.262.- P. C384–C390.
46. Schwarz G., Callewaert G., Droogmans G., Nilus B. Shear stress-induced calcium transients in endothelial cells from human umbilical cord veins// *J Physiol (Lond)*.- 1992.-V 458.- P 527–538.
47. Kanai A. J., Strauss H. C., Truskey G. A., et al. Shear stress induces atp-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells, measured directly with a porphyrinic microsensor// *Circulation Research*. 1995.-V 77.- P 284–293.
48. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis// *Cell*.-1994.-V 78.- P 927–930.
49. Boger R. Asymmtric dimethylarginin (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials// *Vascular Medicine*.- 2005 .- V 10.- P 19–25.
50. Yildirim A. O., Bulau P., Zakrzewicz D., Kitowska K. E., et al. Increased Protein Arginine Methylation in Chronic Hypoxia: Role of Protein Arginine Methyltransferases // *Am J Respir Cell Mol Biol*.- 2006.- V. 35.- № 4.- P. 436–443.
51. Brown K. S., Kluijtmans L. A., Young I. S., et al. Genetic evidence that nitric oxide modulates homocysteine: the NOS3 894TT genotype is a risk factor for hyperhomocysteinemia// *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.- 2003.- V 23.- P 1014–1020.
52. Mardsen P.A., Schappert K.T., Chen H.S. Flowers M. et al. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase// *FEBS Lett*. - 1992. - Vol. 307. - P. 287– 293.
53. Затеищиков Д.А., Чумакова О.С., Затеищикова А.А., Зотова И.В., и др. Генетические предикторы неблагоприятного течения заболевания у больных ишемической болезнью сердца высокого риска по данным 2-летнего наблюдения// *Кардиология*.- 2004.- 12 .-С. 16–22.
54. Shaw G. M. , Iovannisci D. M., Yang W., et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) genetic variants, maternal smoking, vitamin use, and risk of human orofacial clefts// *Am J Epidemiol*.- 2005.- V. 162.- №. 12.- P 1–8.
55. Olsen S.P., Clapham D.E., Davies P.F. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells// *Nature*.- 1988.- V 331.- P.-168–170.
56. McLaughlin T., M. Stϋhlinger, C. Lamendola, F. et al. Plasma Asymmetric Dimethylarginine Concentrations Are Elevated in Obese Insulin-Resistant Women and Fall with Weight Loss// *J Clin Endocrin Metab*.- V 91.- № 5.- P 1896–1900.
57. Nijveldt R. J., Siroen M. P. C., Teerlink T., van Leeuwen P. A. M. Elimination of Asymmetric Dimethylarginine by the Kidney and the Liver: A Link to the Development of Multiple Organ Failure?// *J. Nutr*.- 2004.- V 134.-10.- P 2848S–2852S.
58. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance// *Vascular Medicine*.- 2005.- V 10.- S73–81.
59. 56. Boger R. H., Bode-Boger S. M. Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases // *Seminars in thrombosis and hemostasis*.- 2000.-V. 26.- № 5.- P. 539–545.
60. 57. Zhloba A.A., Blashko E.L., Bercovich O.A., Chromova N. V. et al. Plasma NO-synthase productes value and total homocysteine in postinfarct patients// *International Congress “Hypertension - from Korotkov to present days”*.- Saint Petersburg.- September 15 -17 .- 2005.- P. 148.