

УДК 577.152.3

О. В. Аكوпова, канд. хім. наук,

О. М. Харламова, канд. хім. наук,

Г. Л. Вавілова, канд. хім. наук,

В. Ф. Сагач, д-р мед. наук, чл.-кор. НАН України

ДІЯ ОКСИДУ АЗОТУ *IN VIVO* НА Na-НАСОС ЕНДОТЕЛІЮ АОРТИ ЩУРІВ

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

Чимало літературних джерел присвячено вивченню фізіологічних функцій оксиду азоту (NO) та молекулярних механізмів його фізіологічної дії. Однак, у фокусі уваги дослідників знаходилися, головним чином, механізми, через посередництво яких здійснюється вазодилататорна дія NO [1]. Значно менше вивчена роль NO в регуляції іонного гомеостазу тканин, особливо тканин серцево-судинної системи. Ця функція NO може здійснюватися шляхом його впливу на Na-насос (Na⁺, K⁺-АТРаза, КФ 3.6.1.37) — фермент, який є однією з ключових ланок у механізмі підтримки іонного гомеостазу клітин [2]. Активний транспорт Na⁺ і K⁺ через плазматичні мембрани спрямований на збереження високого мембранного потенціалу і сполучений із регуляцією надходження Ca²⁺ у клітину через Na⁺/Ca²⁺ обмін, забезпечує Na-насоса безпосередню участь у механізмах вазорелаксації та визначає його суттєву роль у контролі судинного тонуусу [3]. Раніше нами отримано дані, які свідчать про активацію Na-насоса ендотелію аорти в умовах стимуляції біосинтезу NO шляхом введення його біологічного попередника L-аргініну [3], що

свідчать про можливу роль NO як ендогенного фактора регуляції активності Na-насоса *in vivo*.

Отож перед нами постало завдання продовжити вивчення дії NO на Na-насос ендотелію аорти щурів *in vivo* шляхом стимуляції ендогенного синтезу NO бактеріальним ліпополісахаридом (ЛПС), а також шляхом екзогенного введення нітрогліцерину (донора NO), який широко застосовується в клінічній практиці.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проводили на білих щурах лінії Вістар масою тіла 200–250 г. Тканини аорти, видалені у декапітованих тварин, ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2 °C). Зскрібок ендотеліального шару гомогенізували в 10-кратному об'ємі живильного середовища: 0,25 М сахарози, 0,02 М трис-HCl буфера, 1 мМ ЕДТА, рН 7,4, як описано нами раніше [3].

Активність Na⁺, K⁺-АТРази визначали у гомогенатах ендотелію в живильному середовищі такого складу: 25 мМ трис-HCl, рН 7,4, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 3 мМ Na₂ATP, рН 7,4 в

об'ємі 1 мл. Концентрацію білка визначали за Лоурі. Реакцію розпочинали додаванням Na₂ATP і проводили впродовж 10 хв при 37 °C, а потім призупиняли її додаванням додецилсульфату Na до кінцевої концентрації 0,3 %. Na⁺, K⁺-АТРазну активність визначали за приростом неорганічного фосфору (P_i) методом Фіске — Суббароу [3] як різницю між загальною Mg²⁺, Na⁺, K⁺-АТРазною активністю та Mg²⁺ АТРазною активністю за наявності 10⁻³ М убаїну і виражали у мкмоль P_i на 1 мг білка за 1 год.

У дослідах *in vivo* ЛПС, L-NAME, нітрогліцерин та інші препарати вводили внутрішньочеревинно в ізотонічному розчині NaCl.

У роботі використані такі реагенти: додецилсульфат Na, трис (основа), “Serva” (ФРН), Na₂ATP, “Reanal” (Угорщина), ЛПС, нітропрусид Na, L-NAME, убаїн “Sigma” (США) та реактиви вітчизняного виробництва марки ч. д. а. Всі розчини готували на бідистильованій воді. Результати представлені як середнє ± стандартне відхилення. Вірогідність оцінювали з допомогою t-критерію Стьюдента. Величину P < 0,05 вважали статистично значущою.

Результати дослідження та їх обговорення

Згідно з літературними даними, введення ЛПС викликає досить швидке (впродовж 4 год після введення препарату) підвищення експресії індукбельної ізоформи NO-синтази (NOS-II) в різних тканинах організму, зокрема у тканині судинного ендотелію [4; 5]. Вводили ЛПС дозою 1 мг/кг маси тіла [5]. При цьому спостерігалось статистично вірогідне підвищення активності Na-насоса на 34,8 %, $P < 0,05$ (рис. 1). Інгібітор NOS, L-NAME (20 мг/кг) ліквідував активацію Na^+ , K^+ -АТРази ліпополісахаридом. Потрібно відмітити, що гальмування базальної активності NOS L-NAME не приводить до зміни активності Na-насоса. Отже, отримані дані довели активацію Na^+ , K^+ -АТРази за умов певного підвищення ендогенної продукції NO та ще й, мабуть, у результаті експресії в ендотелії NOS-II, викликаній бактеріальним ліпополісахаридом.

Для вивчення дії екзогенного NO на Na-насос *in vivo* використовували нітрогліцерин (НГ), який широко застосовується для лікування низки захворювань серцево-судинної системи (ішемічна хвороба

серця, його недостатність, артеріальна гіпертензія та ін.) [7]. Результати експерименту показують, що введення НГ дозою 250 мкг/кг призводить до швидкого і різкого підвищення активності Na-насоса на 87,5 %, $P < 0,01$ (див. рис. 1). Тобто, активація електрогенного Na^+/K^+ обміну, мабуть, бере участь у механізмах, які забезпечують відому вазодилаторну та гіпотензивну дію препаратів-донорів NO. Введення низьких доз НГ (25 мкг/кг) не приводило до статистично значущих змін активності Na-насоса (рис. 2). На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що активація Na-насоса оксидом азоту відбувається на фоні певного зростання рівня NO в ендотелії порівняно з базальним як внаслідок стимуляції його ендогенного синтезу, так і при екзогенному введенні.

Однак, подальше вивчення впливу НГ на активність Na-насоса ендотелію показало, що підвищення доз НГ до 500 і 1000 мкг/кг веде до пригнічування ферменту відповідно на 45,7 % ($P < 0,05$) і 56,7 % ($P < 0,01$) (див. рис. 2). Одночасне з НГ введення метиленового синього, інгібітора цГМФ-залежного шляху дії NO ($5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) не відновлює гальмування Na-насоса підви-

щеними дозами НГ і дає підстави припускати, що пригнічення активності ферменту нітрогліцерином не є цГМФ-залежним.

Отже, за умов експерименту *in vivo* проявляється дозозалежна дія НГ на Na-насос. При цьому також потрібно відзначити, що між дією НГ *in vivo* і безпосереднім впливом донорів NO нітропрусида Na та НГ на активність Na-насоса ендотелію аорти *in vitro* спостерігається певна кореляція, яка полягає в активації ферменту низькими концентраціями і його пригнічуванні високими концентраціями донорів NO (таблиця). Дані, які отримані на мембранних препаратах, виділених з міокарда щурів, показують, що пригнічування Na^+ , K^+ -АТРази 10^{-3} моль/л нітропрусида Na на 29,8 % супроводжується відповідним зниженням вмісту вільних (відновлених) тіолових груп на 42,3 % ($P < 0,05$), які вказують на окислювальну модифікацію ферменту і його мембранного оточення високими концентраціями донора NO *in vitro*.

Принагідно зазначимо, що в літературі практично відсутні дані про пригнічування Na-насоса шляхом окислення тіолових груп ферменту оксидом азоту *in vivo*. Отримані нами



Рис. 1. Вплив ліпополісахариду (ЛПС), нітрогліцерину (НГ) і L-NAME на активність Na^+ , K^+ -АТРази ендотелію аорти.

Дози препаратів: ЛПС — 250 мг/кг; L-NAME — 20 мг/кг; НГ — 250 мг/кг. За віссю ординат активність Na^+ , K^+ -АТРази, мкмоль Pi/год на 1 мг білка.

* — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$ (порівняно з контролем)

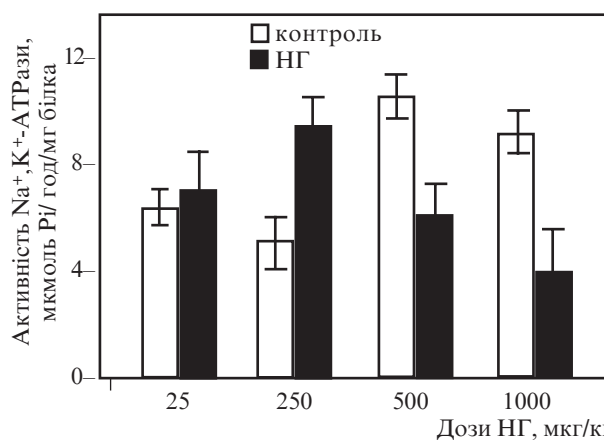


Рис. 2. Вплив нітрогліцерину на активність Na^+ , K^+ -АТРази ендотелію аорти в умовах *in vivo*.

За віссю абсцис — дози нітрогліцерину, мкг/кг; за віссю ординат — активність Na^+ , K^+ -АТРази, мкмоль Pi/год на 1 мг білка

Вплив нітропрусида Na і нітрогліцерину *in vitro* на активність Na⁺, K⁺-АТФази ендотелію аорти щурів, M±m

C, моль/л		Нітропрусид Na	Нітрогліцерин
0	A Δ, %	3,7±0,4 (11)	5,3±0,3 (6)
10 ⁻⁶	A Δ, %	4,4±0,6 (12) +21,6 %*	5,6±0,5 (7) +5,6 %
10 ⁻⁵	A Δ, %	3,6±0,5 (10) -2,7 %	6,5±0,5 (6) +20,7 %*
10 ⁻⁴	A Δ, %	3,5±0,7 (10) -8,1 %	4,0±0,8 (10) -35,5 %*
10 ⁻³	A Δ, %	2,6±0,3 (12) -29,8 %*	3,5±0,3 (10) -42,8 %**

Примітка. m — стандартна похибка, у дужках зазначена кількість вимірів; A — активність, мкмоль Pi/год на 1 мг білка; Δ — % змін активності; * — P≤0,05; ** — P≤0,01 (відносно контролю).

чин порушення іонного гомеостазу судинного ендотелію та його дисфункції, яка сприяє розвитку (чи поглибленню) патології серцево-судинної системи, що зобов'язує до подальших наукових досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Роль ендотелію та біологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу і діяльності серця / О. О. Мойбенко, В. Ф. Сагач, Л. М. Шаповал та ін. // Фізіол. журн. — 1997. — Т. 43, № 1-2. — С. 3-18.
2. Болдырев А. А., Мельгунов В. И. Транспортные АТФазы. Итоги науки и техники. Биофизика. — М.: ВИНТИ, 1985. — Т. 17. — 241 с.

3. Участь L-аргініну в корекції активності мембранних транспортних ферментів Na⁺, K⁺, Ca²⁺ та Na⁺-АТФази за умов експериментальної гіперхолестеринемії / Г. Л. Вавілова, О. М. Прокопенко, О. М. Харламова, В. Ф. Сагач // Фізіол. журн. — 2000. — Т. 46, № 1. — С. 25-31.

4. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов / Ж.-К. Стокле, Б. Мюлле, Р. Андрианцохайна, А. Клецев // Биохимия. — 1998. — Т. 63. — С. 976-983.

5. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues *in vivo* by lipopolysaccharide / T. Sonoki, A. Nagasaki, T. Gotoh et al. / J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 3689-3693.

6. Гуглина М. Э. Большие дозы нитроглицерина при кардиогенном шоке // Клини. медицина. — 1997. — № 6. — С. 27-30.

експериментальні результати дозволяють припустити таку можливість. Однак, згідно з нашими даними, подібна ситуація може створюватися лише за умов, коли вміст NO в ендотелії набагато перевищує його фізіологічний рівень.

Висновки

1. Результати проведеного експерименту показали дозозалежність дії оксиду азоту на Na-насос як *in vivo*, так і *in vitro*.

2. Стимуляція ендогенного синтезу NO ліпополісахаридом, як і введення нітрогліцерину загальнотерапевтичними дозами [6], активують Na-насос, що очевидно вносить певний вклад у вазодилататорну та гіпотензивну дію препаратів-донорів NO.

3. За умов активації біосинтезу NO ліпополісахаридом не виявлено пригнічення активності Na-насоса, однак високі дози оксиду азоту, введені екзогенно, пригнічують фермент. Даний ефект *in vivo* не є цГМФ-залежним, але, як і за умов *in vitro*, можливо, обумовлений окислювальною модифікацією ферменту.

Результати проведених досліджень дають підстави припускати, що пригнічення Na-насоса за умов гіперпродукції NO може бути однією із при-

УДК 577.152.3
ДІЯ ОКСИДУ АЗОТУ *in vivo* НА Na-НАСОС ЕНДОТЕЛІЮ АОРТИ ЩУРІВ

О. В. Акіпова, О. М. Харламова, Г. Л. Вавілова, В. Ф. Сагач

Вивчення дії оксиду азоту на Na-насос ендотелію аорти щурів *in vivo* стимуляцією ендогенного синтезу NO бактеріальним ліпополісахаридом (ЛПС), а також екзогенним введенням нітрогліцерину проведено на щурах. Вивчали ефекти ліпополісахариду, L-NAME і нітрогліцерину на ферментативну активність Na⁺/K⁺-АТФази у гомогенатах ендотелію аорти. Встановлений дозозалежний ефект NO на Na-насос як *in vivo*, так і *in vitro*. Введення ЛПС і фармакологічних доз нітрогліцерину приводить до активації Na-насоса. Високі дози донаторів NO приводять до інгібіції Na⁺/K⁺-АТФази. Отримані результати показують, що порушення іонного гомеостазу судинного ендотелію, індуковане гіперпродукцією NO, є одним із провідних механізмів розвитку ендотеліальних дисфункцій і патології серцево-судинної системи.

Ключові слова: нітрогліцерин, оксид азоту, натрієвий насос, бактеріальний ліпополісахарид.

UDC 577.152.3
THE ACTION OF NITRIC OXIDE *IN VIVO* ON Na-PUMP ENDOTHELIUM OF RAT'S AORTA

O. V. Akopova, O. M. Harlamova, G. L. Vavilova, V. F. Sagach

The studying of the action of nitric oxide to Na-pump endothelium of rat's aorta *in vivo* by stimulation of bacterial lipopolisaccharide as well as by the exogenic intraduction of nitroglycerine, was carried out on the rats. It was studied the effects of lipopolisaccharide, L-NAME and nitroglycerine on enzyme's activity of Na⁺/K⁺-ATP in homogenates of the aorta endothelium. A dose-depending effect of NO on Na-pump both *in vivo* and *in vitro* was established. The injection of lipopolisaccharide and farmacological doses of nitroglycerine leads to Na-pump activation. The high doses of donators NO lead to Na⁺/K⁺-ATP inhibition. The received results show, that the disturbance of ion homeostasis of vascular endothelium, inducted by NO hyperproduction is one of the main mechanisms of endothelium disfunctions development and cardiac-vascular system pathology.

Key words: nitroglycerine, nitric oxide, Na-pump, bacterial lipopolisaccharide.