

О.В. Аكوпова, О.М. Харламова, А.В. Коцюруба, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач

Вплив оксиду азоту на Na^+ , K^+ -АТФазу в тканині аорти щурів

Изучено влияние оксида азота (NO) in vivo на активность Na^+ , K^+ -АТФазы аорты крыс с помощью стимуляции его эндогенного синтеза бактериальным липополисахаридом (ЛПС), а также введения разных доз фармакологического донора NO нитроглицерина (НГ). Показано, что влияние NO на Na^+ , K^+ -АТФазу аорты in vivo является дозозависимым. Стимуляция эндогенного синтеза NO путем повышения экспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы, как и введение НГ в дозах, применяемых в клинике, приводит к активации Na^+ , K^+ -АТФазы и, вероятно, вносит вклад в вазодилататорное и гипотензивное действие фармакологических доноров NO. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы аорты зависит от баланса активных форм кислорода и азота и определяется уровнем депонирования NO в тканях аорты в виде высокомолекулярных нитрозилированных белков, а также – интенсивностью свободнорадикальных реакций с образованием гидропероксидных радикалов. На основании проведенного исследования сделано заключение, что NO – NOS – цГМФ-зависимый механизм, по крайней мере частично, принимает участие в активации Na^+ , K^+ -АТФазы ЛПС и донором NO, однако ингибирование фермента оксидом азота in vivo не является цГМФ-зависимым, а обусловлено активацией свободнорадикальных реакций на фоне высокого уровня нитрозилирования мембранных структур аорты крыс.

ВСТУП

Відомо, що оксид азоту (NO) є одним із універсальних регуляторів фізіологічних функцій організму з надзвичайно широким спектром дії. Зміни рівня експресії різних ізоформ NO-синтази (NOS), нестача або гіперпродукція NO, що спостерігається за патологічних станів, призводять до значного дисбалансу вмісту активних форм азоту та кисню в організмі та відповідно – до порушення NO-залежних механізмів регуляції кровообігу і роботи серця [8, 19].

Нині детально дослідженим є механізм вазодилататорної дії NO, що здійснюється як цГМФ-залежним шляхом [19], так і безпосередньо за допомогою модуляції окисно-відновного стану клітинних тіолів [7], у тому числі й тих, що входять до складу активних центрів або регуляторних сайтів іонних каналів і ферментів, котрі відіграють важливу роль у регуляції тонуусу судин.

Менше вивченою залишається роль NO у контролі механізмів регуляції натрієвого та калієвого гомеостазу в організмі, які однак також забезпечують підтримання фізіологічно необхідного вмісту цитозольного Ca^{2+} [14]. Ця функція оксиду азоту може зокрема реалізовуватися через його дію на Na^+ , K^+ -АТФазу (Na^+ , K^+ -насос, КФ 3.6.1.37) – фермент, що є однією з ключових ланок системи іонного транспорту у тканинах різного функціонального призначення [5]. Активний транспорт Na^+ та K^+ через плазматичні мембрани, спрямований на підтримання високого мембранного потенціалу клітин та обмеження надмірного надходження Ca^{2+} через Na^+ - Ca^{2+} -обмінник і потенціалкервані кальцієві канали, визначає безпосередню участь Na^+ , K^+ -насоса у механізмах вазорелаксації та регуляції кальцієвого гомеостазу тканин серцево-судинної системи [14].

© О.В. Аكوпова, О.М. Харламова, А.В. Коцюруба, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач

Нині добре відомо, що активність Na^+ , K^+ -АТФази може швидко змінюватися під дією широкого спектра гормональних факторів і фізіологічно активних агентів [16]. Встановлено, що функціонування Na^+ , K^+ -насоса модулюється сигнальними механізмами клітин за участю цАМФ і протеїнкінази С [13]. Але експериментальні дані щодо конкретної дії NO- та цГМФ-залежних механізмів на активність Na^+ , K^+ -АТФази залишаються досить обмеженими і суперечливими.

Отже, набуває актуальності питання про можливі механізми впливу оксиду азоту на Na^+ , K^+ -насос *in vivo*. Ця ендогенна регуляція може здійснюватися різними метаболічними шляхами: ферментативного відновлення нітрату [10] при введенні, наприклад, донора NO нітроглицерину; неферментативного розпаду нітрозотіолів [7, 9]; синтезу NO *de novo* внаслідок підвищення експресії індукцибельної ізоформи NOS (iNOS), а також – активацією конститутивних ізоформ NOS (ендотеліальної та нейрональної) при введенні екзогенного L-аргініну – природного субстрату NOS [9, 11, 21].

Метою нашої роботи було дослідження впливу оксиду азоту на активність Na^+ , K^+ -насосу в аорті щурів *in vivo* в умовах підвищення рівня NO за допомогою зазначених метаболічних перетворень – внаслідок введення L-аргініну (активація eNOS), бактеріального ліпополісахариду (підвищення рівня експресії iNOS) і фармакологічного донора NO нітроглицерину (активація ферментативного ресинтезу NO з нітрату) та з'ясувати, чи дійсно оксид азоту є ендогенним регулятором функціональної активності Na^+ , K^+ -АТФази в аорті щурів.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах лінії Вістар масою 200–250 г. Аорти, видалені у декапітованих тварин, ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2°C),

подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища: 250 ммоль/л сахарози, 20 ммоль/л тріс-НCl буфера, 1 ммоль/л ЕДТА, рН 7,4. Вміст білка визначали за Лоурі.

Активність Na^+ , K^+ -АТФази визначали у середовищі такого складу (ммоль/л): тріс-НCl буфера – 25, MgCl_2 – 5, NaCl – 100, KCl – 10, Na_2ATP – 3, рН 7,4 у об'ємі 1 мл за приростом неорганічного фосфору (P_i) методом Фіске – Суббароу як різницю між загальною Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФазною та Mg^{2+} -АТФазною активністю за наявності 10^{-3} моль/л убаїну і виражали у мікромолях P_i на 1 мг білка за 1 год.

Концентрацію стабільних метаболітів NO, нітриту (NO_2^-) та нітрату (NO_3^-), а також вміст нітрозотіолів визначали спектрофотометричним методом Гріна [17]. Вміст високомолекулярних нітрозотіолів (нітрозильованих білків) розраховували як різницю між загальною їх кількістю та вмістом низькомолекулярних нітрозотіолів, як описано нами раніше [1]. Основну частку низькомолекулярних нітрозотіолів становить нітрозоглутатіон.

Вміст пероксиду водню (H_2O_2) визначали спектрофотометрично у KJ/лактопероксидазній системі у 0,05 ммоль/л фосфатному буфері (рН 7,33) при 353 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $26000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [18].

Утворення гідроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$) оцінювали за описаним методом [15] в інкубаційній суміші: 20 ммоль/л дезоксирибози, 1 ммоль/л H_2O_2 у 20 ммоль/л Na-фосфатному буфері (рН 7,4); генерацію $\cdot\text{OH}$ -радикала визначали за утворенням малонового діальдегіду, за зміною поглинання при 532 нм і виражали в одиницях поглинання OD за 1 год на 1 мг білка. Максимальна зміна світлопоглинання внаслідок утворення $\cdot\text{OH}$ -радикала становила $(25,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \text{ год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.

У дослідах *in vivo* внутрішньоочередово робили ін'єкцію L-аргініну (250 мг/кг), L-NAME (20 мг/кг), бактеріального ліпо-

полісахариду (1 мг/кг), мелатоніну (10 мг/кг) та нітрогліцерину в ізотонічному розчині NaCl. Аорти видаляли через 30 хв після введення ліпополісахариду. Контрольним щурам вводили фізіологічний розчин.

У роботі використано такі реагенти: додецилсульфат Na, тріс (основа), ("Serva", Німеччина), Na₂АТФ, ("Reanal", Угорщина), L-аргінін, L-NAME (N^G-нітроаргінін, метиловий ефір), убаїн, бактеріальний ліпополісахарид, ("Sigma", США) та реактиви вітчизняного виробництва марки ч.д.а. Розчини готували на бідистильованій воді. Достовірність оцінювали за критерієм t Стьюдента. Значення P < 0,05 вважали статистично достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що екзогенне введення L-аргініну безпосередньо стимулює синтез NO в ендотелії судин конститутивними ізоформами NOS [11, 21]. Конкурентні системи синтезу L-аргініну та його перетворень, зокрема NO-синтазним і аргіназним шляхом [21], дають змогу підтримувати певний вміст субстрату для синтезу NO різними ізоформами NOS в ендотелії та інших тканинах організму у фізіологічних умовах, забезпечуючи тим самим функціонування одного з основних механізмів контролю тону судин. Нещодавно нами показано, що фермент аргіназа конкурує в основному із конститутивними ізоформами (eNOS, nNOS), але не iNOS [11]. Також було встановлено підвищення активності Na⁺, K⁺-АТФази ендотелію та кори нирок (на 25,0 і 15,0 % відповідно, P < 0,05) в умовах *in vivo*, внаслідок тривалого введення L-аргініну що, за нашими припущеннями, пояснюється підвищенням утворенням NO відповідними тканинами [6]. Однак у проведеній серії дослідів не було враховано можливість конкурентних перетворень L-аргініну та участь інших, окрім NO, продуктів його метаболізму в активації Na⁺,

K⁺-АТФази. До того ж, результати, одержані в умовах *in vitro*, свідчать, що у низьких концентраціях L-аргінін безпосередньо впливає на мембранне оточення Na⁺, K⁺-АТФази, викликаючи підвищення активності ферменту в ендотелії аорти [2]. Отже, дія L-аргініну не може однозначно пояснюватися стимуляцією синтезу NO eNOS. Тому оцінювали можливі зміни активності Na⁺, K⁺-АТФази *in vivo* також і за умов незалежної від метаболізму L-аргініну стимуляції ендогенного синтезу NO бактеріальним ліпополісахаридом, який за літературними даними, викликає швидке підвищення експресії NOS, а саме ізоформи NOS-II (iNOS) у різних тканинах організму, зокрема в ендотелії аорти [22].

Щоб з'ясувати, чи впливає на активність Na⁺, K⁺-АТФази оксид азоту, синтезований неконститутивно, робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію ліпополісахариду у дозі 1 мг/кг. Згідно з літературними даними, таке введення викликає швидке (протягом 20 хв) збільшення активності NOS внаслідок експресії iNOS [22]. Одержані результати показують, що одноразове введення ліпополісахариду, як і тривале введення L-аргініну, викликає статистично достовірне підвищення Na⁺, K⁺-АТФазної активності в аорті щурів (34,8 %, P < 0,05, рис. 1). Пригнічення NO-синтазної активності неселективним інгібітором NOS, L-NAME (20 мг/кг) не впливає на активність Na⁺, K⁺-АТФази і водночас усуває активацію ферменту ліпополісахаридом (див. рис. 1). Одержані результати збігаються з нашими попередніми даними, які свідчать про активацію Na⁺, K⁺-АТФази ендотелію аорти *in vivo* при стимуляції конститутивного синтезу NO його попередником L-аргініном [6], і дають змогу стверджувати, що після ін'єкції ліпополісахариду активація ферменту здійснюється за NO-, NOS-залежним механізмом також і внаслідок підвищення рівня експресії iNOS, тобто *de novo* через синтез NO.

Отже, стимуляція біосинтезу NO *in vivo* L-аргініном і ліпополісахаридом призводить до статистично достовірного підвищення Na^+ , K^+ -АТФазної активності в аорті щурів. Таким чином, ендогенний NO, незалежно від шляху його синтезу, є регуляторним фактором змін активності Na^+ , K^+ -насоса в аорті, які відбуваються за умов певного підвищення базального вмісту NO. Інгібітор NOS L-NAME не впливає на активність Na^+ , K^+ -АТФази (див. рис. 1), яка за умов інгібування всіх ізоформ NOS залишається у мережах контрольних значень.

Для вивчення ролі NO, синтезованого відновленням кінцевих продуктів його метаболізму (нітритів і нітратів), у регуляції Na^+ , K^+ -насоса досліджували вплив різних доз фармакологічного донора NO, нітрогліцерину на активність Na^+ , K^+ -АТФази, а також на вміст активних форм азоту у тканинах аорти. Рівень активних форм азоту оцінювали за вмістом стабільних метаболітів: нітрит- та нітрат-аніонів, NO_2^- та NO_3^- , а також низькомолекулярних і високомолекулярних нітрозотіолів, тобто нітрозильованих високомолекулярних

мкмоль P_i ·год $^{-1}$ ·1мг $^{-1}$ білка

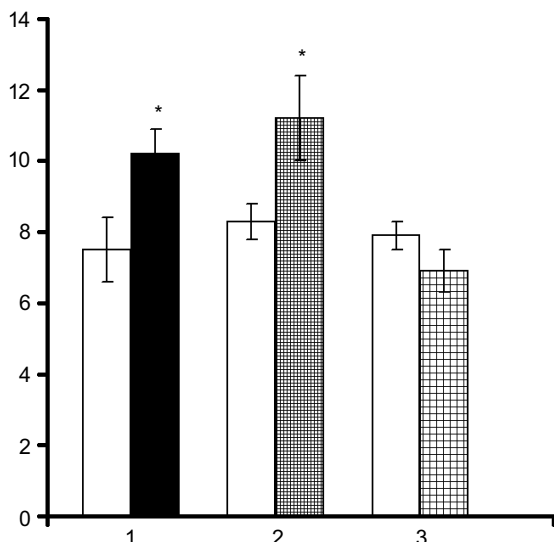


Рис. 1. Вплив L-аргініну та ліпополісахариду на активність Na^+ , K^+ -АТФази аорти щурів *in vivo*: 1 – контроль, 2 – аргінін, 3 – ліпополісахарид, 4 – ліпополісахарид і L-NAME

білків. Паралельно оцінювали вміст активних форм кисню за вмістом стабільного продукту перетворень O_2 , пероксиду водню (H_2O_2) та рівнем генерації високонестабільного гідроксил-радикала (OH -радикала) у тканині аорти [15], оскільки в наших попередніх дослідженнях [1] встановлено значний приріст активних форм кисню, переважно мітохондріального походження, після введення нітрогліцерину в міокарді щурів.

Відомо, що нітрат і нітрит, – кінцеві продукти перетворень NO, – є субстратами для його ресинтезу нітрат- і нітрит-редуктазами [10]. Нітрозотіоли також є джерелом утворення вільнорадикального NO переважно через їх неферментативний розпад, наприклад, під дією важких металів [7, 9]. Таким чином, пул високоактивних вільнорадикальних форм NO може поповнюватися внаслідок ферментативних і неферментативних перетворень через відновлення та реутилізацію стабільних кінцевих продуктів метаболізму NO нітрату та нітриту, які вивільнюються при введенні нітрогліцерину.

Одержані результати (рис. 2) показують, що NO, синтезований з нітрату, який

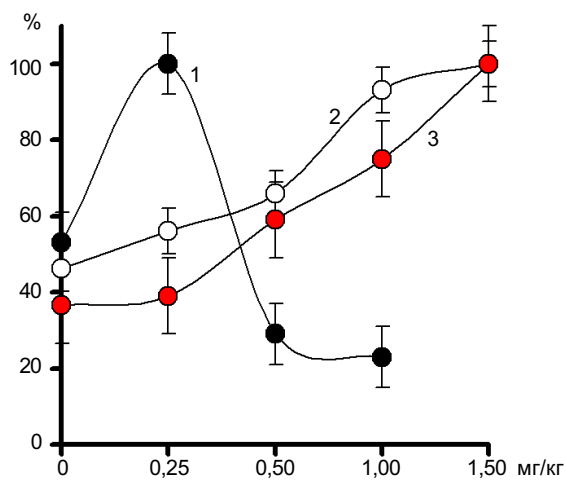


Рис. 2. Вплив нітрогліцерину на зміну показників: активності Na^+ , K^+ -АТФази (1), вмісту високомолекулярних нітрозотіолів (2) та рівня утворення OH -радикала (3) в аорті (у відсотках від максимальних значень)

вивільнюється при введенні нітроглицерину *in vivo*, дозозалежно впливає на активність Na^+ , K^+ -АТФази аорти. Так, введення нітроглицерину у дозі 0,25 мг/кг призводить до швидкого (протягом 30 хв) підвищення активності ферменту майже вдвічі (від $7,6 \pm 0,5$ у контролі до $14,3$ мкмоль $\text{P}_i \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \pm 0,5$ мкмоль $\text{P}_i \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ за дії нітроглицерину, $P < 0,01$; на 87,5 %, $P < 0,01$; див. рис. 2). Отже, можна припустити, що активація електрогенного Na^+ - K^+ -обміну бере участь у механізмах, що забезпечують вазодилаторну та гіпотензивну дію препаратів-донорів NO. Втім підвищення дози нітроглицерину до 0,5 мг/кг призводить до значного інгібування Na^+ , K^+ -насоса (на 45,7 %, $P < 0,01$; див. рис. 2), яке посилюється з подальшим збільшенням дози нітроглицерину (див. рис. 2) і підвищенням пулу реутилізаційного NO.

Аналіз змін вмісту активних форм азоту та кисню в аорті під дією різних доз нітроглицерину показує, що відносний внесок метаболітів NO змінюється порізно на тлі загального значного приросту вмісту активних форм азоту (рис. 3). Так, результати свідчать, що при введенні нітроглицерину у дозах більших ніж 0,25 мг/кг різкий приріст активних форм азоту

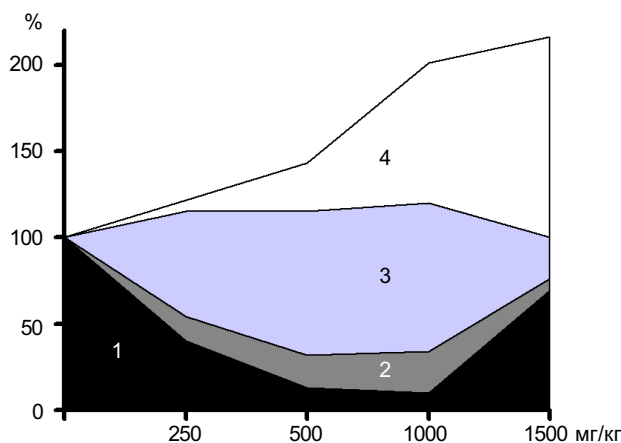


Рис. 3. Зміна вмісту активних форм азоту: нітрату (1), низькомолекулярних нітрозотіолів (2), нітриту (3) та високомолекулярних нітрозотіолів (4) в аорті під дією нітроглицерину (у відсотках відносно контролю)

відбувається за рахунок високомолекулярних нітрозотіолів максимальний вміст яких сягав $0,791$ мкмоль/мг $\pm 0,04$ мкмоль/мг (див. рис. 2; рис. 3). Вміст низькомолекулярних активних форм азоту (NO_2^- та NO_3^-) у контролі становить відповідно $0,20 \pm 0,02$ та $0,11$ мкмоль/мг $\pm 0,01$ мкмоль/мг і майже не змінюється (NO_2^-) або навіть значно знижується (NO_3^- , низькомолекулярні нітрозотіоли), (див. рис. 3). Спостерігається також зниження вмісту пероксиду водню (див. рис. 4). Водночас разом із зниженням вмісту стабільних активних форм кисню (H_2O_2) особливо помітне різке підвищення рівня генерації гідроксил-радикала (див. рис. 4), що може свідчити про посилення швидких окисних реакцій за участю високотоксичних і нестабільних радикалів кисню й азоту в умовах посиленого надлишкового синтезу NO з нітрату та нітрозотіолів внаслідок введення нітроглицерину.

Отже, при введенні низьких доз нітроглицерину (0,25 мг/кг) активація Na^+ , K^+ -АТФази здійснюється помірними дозами NO, за допомогою реутилізації кінцевих продуктів – нітрату та низькомолекулярних нітрозотіолів. Одночасно знижується вміст

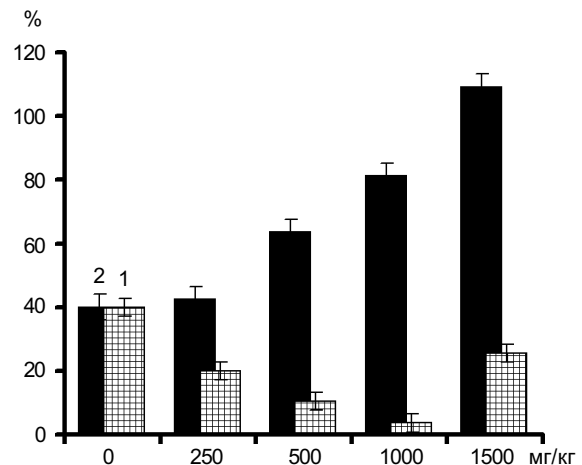


Рис. 4. Зміна вмісту активних форм кисню, пероксиду водню (1) та гідроксил-радикала (2) в аорті під дією нітроглицерину (у відсотках відносно контролю). Рівень $\cdot\text{OH}$ -радикала виражали як зміну світлопоглинання за 1 год на 1 мг білка

активних форм кисню (вміст H_2O_2 від контрольного $44,1 \text{ нмоль/мг} \pm 3,2 \text{ нмоль/мг}$ знижується майже вдвічі (див. рис. 4)) та низькомолекулярних активних форм азоту – NO_3^- та нітрозоглутатіону (див. рис. 3) на тлі підвищення частки високомолекулярних нітрозильованих білків від загального вмісту активних форм азоту (див. рис. 2). Однак подальше збільшення дози нітрогліцерину (до $0,5\text{--}1,0 \text{ мг/кг}$), яке супроводжується значним підвищенням вмісту високомолекулярних нітрозотіолів в аорті (див. рис. 3), призводить до різкого пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази на $45,7\text{--}56,7 \%$ ($P < 0,01$; див. рис. 2).

Як робочу гіпотезу можна прийняти, що однією з причин інгібування ферменту є подальше посилення ресинтезу, тепер уже надлишкового, NO, переважно з низькомолекулярних активних форм азоту, оскільки значне зниження рівня саме цих активних форм азоту (нітрату та нітрозоглутатіону) спостерігається в аорті щурів (див. рис. 3). Водночас помітно, що пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази (див. рис. 2) відбувається на тлі стрибкоподібного приросту рівня синтезу $\cdot\text{OH}$ -радикала у тканинах аорти (див. рис. 2; рис. 3). Відомо, що одним із джерел вивільнення $\cdot\text{OH}$ -радикала є пероксинітрит, який за участі супероксид-аніона може утворюватись у великих кількостях в умовах надлишкового синтезу NO. Втім, оскільки за нашими результатами одночасно із посиленням генерації гідроксил-радикала реципрокно виснажується пул H_2O_2 (див. рис. 4), можна припустити, що значна частка $\cdot\text{OH}$ -радикала утворюється саме з гідропероксиду за відомими реакціями Фентона чи Габер–Вайса.

Отже, наші результати показують, що найбільш вірогідною причиною інгібування Na^+ , K^+ -АТФази в аорті є не стільки утворення високомолекулярних нітрозотіолів, вміст яких підвищується лише незначно, при збільшенні дози нітрогліцерину від $0,25$

до $0,5 \text{ мг/кг}$ (див. рис. 3), і не NO, що утворюється через відновлення нітрату та низькомолекулярних нітрозотіолів, скільки різке посилення швидких вільнорадикальних реакцій з вивільненням $\cdot\text{OH}$ -радикала, вміст якого зростає приблизно у $2,5$ рази ($P < 0,05$) і досить добре корелює зі зниженням на $45,7 \%$ ($P < 0,01$) активності Na^+ , K^+ -АТФази (див. рис. 2; 3).

Таким чином, проведені дослідження доводять, що активність Na^+ , K^+ -АТФази в аорті залежить від балансу активних форм кисню і азоту та визначається депонуванням NO у тканинах у вигляді нітрозильованих білків [7], вивільненням низькомолекулярних активних форм азоту, а також інтенсивністю вільнорадикальних реакцій з утворенням високотоксичних гідропероксидних радикалів. Одержані результати добре корелюють із даними нашого попереднього дослідження [1], в яких встановлено переважно мітохондріальне походження пулів активних форм кисню і азоту при введенні нітрогліцерину, і вказують на важливу роль мітохондрій (де саме і локалізується нітрат-редуктаза [10]) у метаболізмі NO та регуляції активності Na^+ , K^+ -АТФази NO-залежним шляхом.

Для подальшого з'ясування природи дозозалежної дії нітрогліцерину на активність Na^+ , K^+ -АТФази нами було досліджено вплив інгібіторів NO- цГМФ-залежного сигнального шляху (метиленового синього та мелатоніну) на активацію та інгібування ферменту донором NO. Одночасне з нітрогліцериним введення інгібітора розчинної гуанілат-циклази, тобто цГМФ-залежного шляху дії NO, метиленового синього ($5 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$), зменшує активацію Na^+ , K^+ -АТФази низькими дозами нітрогліцерину на $58,7 \%$ ($P < 0,05$; рис. 5). Відсутність дії метиленового синього на інгібуючий ефект нітрогліцерину вказує на цГМФ-незалежний механізм дії високих доз донора NO.

Відомо, що мелатонін є потужним антиоксидантом і інгібітором NO- та гуа-

нілатциклазного сигнального шляху [12]. Вивчення дії мелатоніну (10 мг/кг), який сам по собі не впливає на активність Na^+ , K^+ -АТФази у контролі, показало суттєве відновлення рівня активності ферменту, пригніченої високими (0,5 мг/кг) дозами нітрогліцерину, від 45,7 до 26,0 % ($P < 0,05$), але при цьому також повне усунення ефекту активації Na^+ , K^+ -АТФази низькими дозами нітрогліцерину (0,25 мг/кг) до контрольного рівня (див. рис. 5).

Таким чином, активація Na^+ , K^+ -АТФази ліпополісахаридом (див. рис. 1) та нітрогліцерином є NOS- та NO-залежною і здійснюється через NO-цГМФ-сигнальний каскад, про що свідчить усунення ефекту у першому випадку L-NAME, а у другому – мелатоніном і метиленовим синім. Водночас найбільш імовірно, що пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази (яке не усувається метиленовим синім, і лише частково усувається мелатоніном) є лише NO-, але не цГМФ-залежним, і корелює з надмірно високим рівнем нітрозилювання клітинних білків *in vivo*. Можна припустити, що у разі інгібування Na^+ , K^+ -АТФази активними метаболітами кисню й азоту, але не самим NO, мелатонін діє саме як потужний

антиоксидант, а не як інгібітор цГМФ-залежного шляху, що і зумовлює часткове усунення інгібування Na^+ , K^+ -АТФази саме мелатоніном, а не метиленовим синім. Можна також припустити, що і повне усунення ефекту активації Na^+ , K^+ -АТФази мелатоніном (див. рис. 4) є наслідком його потужної антиоксидантної дії. Слід зазначити, що наші попередні дані [1] вказують на головним чином мітохондріальне походження активних форм кисню і азоту при введенні нітрогліцерину, яке відбувається одночасно з досить ефективним NO-залежним інгібуванням мітохондріальної пори, індуктора процесів апоптозу та деградації клітин [20]. Введення мелатоніну, потужного антиоксиданта і інгібітора пори, посилює ефективність її блокування оксидом азоту та одночасно “нейтралізує” генерацію токсичних вільних радикалів, яка, за нашими даними, може бути наслідком підвищення вмісту NO.

Метиленовий синій є досить ефективним антагоністом активації Na^+ , K^+ -АТФази, однак на відміну від мелатоніну він виявляється нездатним попереджати інгібувальну дію NO (див. рис. 5). Отже, за результатами дослідження дії ліпополісахариду та нітрогліцерину можна дійти висновку, що NO-, цГМФ-залежний сигнальний каскад, незалежно від метаболічного шляху утворення NO, дійсно бере участь у механізмі активації Na^+ , K^+ -АТФази оксидом азоту, яка відбувається на тлі помірного збільшення вмісту нітрозилюваних білків у мембранному оточенні ферменту. На нашу думку, у разі активації Na^+ , K^+ -АТФази відбувається певне поєднання NO-цГМФ-залежного механізму та безпосередньої активації ферменту низькими дозами утворюваних гідропероксидів і вільних радикалів, що цілком можливо за літературними і нашими власними даними [3, 4]. Однак при подальшому збільшенні дози нітрогліцерину спостерігається різке посилення вільнорадикальних процесів з

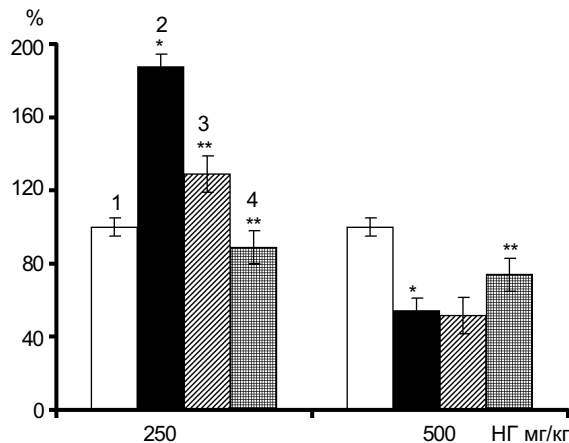


Рис. 5. Вивчення дії нітрогліцерину *in vivo* на активність Na^+ , K^+ -АТФази аорти щурів: 1 – контроль, 2 – нітрогліцерин, 3 – нітрогліцерин за наявності метиленового синього, 4 – нітрогліцерин за наявності мелатоніну. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,01$ відносно дії нітрогліцерину

утворенням високотоксичного гідроксилрадикала на тлі надмірного нітрозилювання мембранного оточення, а можливо, й самого ферменту, що і зумовлює оксидативний і нітрозативний стрес мембранних структур аорти та призводить до пригнічення електрогенного Na^+ , K^+ -насоса.

Таким чином, одержані нами результати дають підстави припускати, що Na^+ , K^+ -насос бере участь у гіпотензивній дії низьких доз NO , тоді як високі дози фармакологічних донорів NO , як і гіперпродукція оксиду азоту в організмі, пригнічують активність Na^+ , K^+ -АТФази та можуть призводити до порушень іонного гомеостазу судинного ендотелію, його дисфункції і розвитку патології серцево-судинної системи.

ВИСНОВКИ

1. У фізіологічних умовах NO , незалежно від метаболічного шляху його утворення, є регулятором змін активності Na^+ , K^+ -АТФази.

2. Дія оксиду азоту на Na^+ , K^+ -АТФазу аорти *in vivo* є дозозалежною. Стимуляція ендогенного синтезу NO внаслідок посилення експресії iNOS , як і введення низьких доз нітрогліцерину, що застосовуються у клініці, призводить до активації ферменту, та дає підстави вважати, що активація Na^+ , K^+ -АТФази робить внесок у вазодилаторну та гіпотензивну дію фармакологічних донорів NO .

3. NO -, cGMP -залежний сигнальний каскад значною мірою зумовлює ефект активації ферменту оксидом азоту.

4. Надлишковий NO , що утворюється при використанні високих доз нітрогліцерину, інгібує Na^+ , K^+ -насос cGMP -незалежним шляхом. Активність Na^+ , K^+ -АТФази в аорті залежить від балансу активних форм кисню і азоту та визначається рівнем депонування NO у тканинах аорти у вигляді високомолекулярних нітрозильованих білків, а також інтенсивністю вільнора-

дикальних реакцій з утворенням гідропероксидних радикалів. Таким чином, інгібування ферменту оксидом азоту *in vivo* не є cGMP -залежним і зумовлюється посиленням вільнорадикальних реакцій на тлі нітрозативного стресу мембранних структур аорти щурів.

O.V. Akopova, O.N. Kharlamova, A.V. Kotsiuruba, Yu.P. Korkach, V.F. Sagach

THE STUDY OF NITRIC OXIDE ACTION IN VIVO ON Na^+ , K^+ -ATPASE IN RAT AORTA

The influence of nitric oxide on Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat aorta was studied by means of stimulation of endogenous NO synthesis after injections of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and pharmacological NO donor nitroglycerine (NG). It was shown that NO action on Na^+ , K^+ -ATPase *in vivo* is dose-dependent. Stimulation of the endogenous NO synthesis by LPS as well as the administration of low doses of NG lead to the activation of Na^+ , K^+ -ATPase and favor the conclusion that NO -dependent Na^+ , K^+ -ATPase stimulation mediates vasodilatory and hypotensive action of nitric oxide. The Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat aorta depends on the balance between the level of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), formation of NO depots in the tissue of aorta as high- and low molecular weight nitrosothiols, and also on the intensity of free-radical reactions resulting in the generation of hydroperoxide radicals. The results obtained suggest that NOS - and cGMP -dependent pathway takes part in Na^+ , K^+ -ATPase activation by LPS and NG, but the enzyme inhibition by nitric oxide *in vivo* is not cGMP -dependent and is determined by the activation of free-radical reactions and dramatic enhancement of nitrosylation level in rat aorta tissue.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акопова О.В., Коцюруба А.В., Ткаченко Ю.П., Сагач В.Ф. Оксид азоту пригнічує відкриття мітохондріальної пори і збільшує кальцієву смність мітохондрій *in vivo* // *Фізіол. журн.* – 2005. – **51**, №3. – С. 3–11.
2. Акопова О.В., Харламова О.Н., Вавилова Г.Л. Влияние L-аргинина на активность Na^+ , K^+ -АТФази эндотелия аорты крысы // *Биохимия.* – 2002. – **67**, №9. – С. 1277–1281.
3. Акопова О.В., Вавилова Г.Л., Харламова О.Н., Сагач В.Ф. Влияние нитропруссиды натрия на Na^+ , K^+ -АТФазу миокарда и коры почек крыс // *Укр. біохім журн.* – 2003. – **75**, №3. – С.
4. Болдырев А.А. Na^+ , K^+ -АТФаза как олигомерный ансамбль // *Биохимия.* – 2001. – **66**. – С.1013–1025.

5. Болдырев А.А., Мельгунов В.И. Транспортные АТФазы. Итоги науки и техники. Биофизика. – М.: ВИНТИ, 1985. – 17. – 241 с.
6. Вавілова Г.Л., Прокопенко О.М., Харламова О.М., Сагач В.Ф. Участь L-аргініну в корекції активності мембранних транспортних ферментів Na^+ , K^+ , Ca^{2+} та Na^+ -АТФаз за умов експериментальної гіперхолестеринемії //Фізіол. журн. – 2000. – **46**, №1. – С. 25–31.
7. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и С-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах // Биохимия, 1998. – **63**, №7. – С.924–938.
8. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. та ін. Роль ендотелію табіологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу і діяльності серця //Фізіол. журн. – 1997. – **43**, №1–2. – С.3–18.
9. Недоспасов А.А. Биогенный NO в конкурентных отношениях //Биохимия. – 1998. – **63**, №7. – С. 881–904.
10. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – **159** с.
11. Сагач В.Ф., Базиліук О.В., Коцюрба А.В., Буханевіч О.М. Порушення ендотелій-залежних реакцій аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії //Фізіол. журн. – 2000. – **46**, №3. – С. 3–13.
12. Acuna-Castroviejo D., Martin M., Macias M. et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics //J. Pineal Res. – 2001. – **30**. – P.65–74.
13. Bertorello A.M., Katz A.I. Short-term regulation of renal Na^+ , K^+ -ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms //Amer. J. Physiol. – 1993. – **265**. – P. F743–F755.
14. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness // Ibid. – **264**. – P. C1367–C1387.
15. Conte D., Narindrasorosa K.S., Sarcar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generated free radicals and caused DNA damage // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, №9. – P.5125–5130.
16. Ewart H.S., Klip A. Hormonal regulation of the Na^+ , K^+ -ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity //Amer. J. Physiol. – 1995. – **269**. – P. C295–C311.
17. Green L.C., David A.W., Glogovski J. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, №1. – P.131–138.
18. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system // Eur. J. Biochem., 1984. – **141**, №1. ² P. 69–74.
19. Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview //J. Cardiovascular. Pharmacol. – 1999. – **34**, №6. – P.879–886.
20. Kroemer G., Zamzami N., Susin S.A. Mitochondrial control of apoptosis //Immunol. Today. – 1997. – **18**. – P. 44–51.
21. Reyes A.A., Karl I.E., Klahr S. Role of arginine in health and in renal disease // Amer. J. Physiol. – 1994. – **267**. – P. F331–F346.
22. Sonoki T., Nagasaki A., Gotoh T. et al. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide //J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 3689–3693.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: circul@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 18.09.2008