

Л.М. Шаповал, О.В. Дмитренко, Г.Л. Вавілова, Л.С. Побігайло, Л.Г. Степаненко, Н.В. Радченко, Т.Л. Давидовська, В.Ф. Сагач

Вплив модуляції Na^+ , K^+ -АТФази нейронів довгастого мозку на гемодинамічні ефекти у щурів із генетично детермінованою гіпертензією

Дослідження проведене на щурах з нормальним тиском (контроль), а також щурах з генетично детермінованою гіпертензією, які були наркотизовані уретаном (1600 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Показано, що у щурів з нормальним артеріальним тиском ін'єкції специфічного інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази оубаїну (10^{-8} – 10^{-5} моль/л) у популяції нейронів довгастого мозку (ядро солітарного тракту, NTS; парамедіанне ретикулярне ядро, РМп; латеральне ретикулярне ядро, LRN), як правило, супроводжувалися залежним від дози підвищенням системного артеріального тиску. У щурів з генетично детермінованою гіпертензією ін'єкції оубаїну в досліджувані медулярні ядра спричинювали розвиток більш виражених порівняно із контрольними щурами гіпер- і гіпотензивних реакцій. Активація Na^+ , K^+ -АТФази кардіоваскулярних нейронів ін'єкціями аспаркаму в медулярні ядра призводила до розвитку гіпотензивних реакцій у контрольних тварин і щурів з генетично детермінованою гіпертензією, але у останніх ефект був більшим. Біохімічними методами виявлені відмінності в активності Na^+ , K^+ -АТФази в мікросомальній фракції довгастого мозку в обох групах тварин: у щурів з генетично детермінованою гіпертензією вона на 61,8 % перевищувала активність ензиму у тварин з нормальним тиском. Отримані результати свідчать про те, що Na^+ , K^+ -АТФаза соматичних мембран нейронів медулярних кардіоваскулярних ядер бере участь у реалізації нервового контролю функції кровообігу, а її пригнічення сприяє розвитку гіпертензії центрального генезу.

Ключові слова: Na^+ , K^+ -АТФаза, оубаїн, медулярні кардіоваскулярні нейрони, гіпертензія.

ВСТУП

Na^+ , K^+ -АТФаза (натрієвий насос) є основним ферментом зовнішньої мембрани клітини, який забезпечує асиметричний розподіл іонів натрію та калію з обох боків плазматичних мембран практично усіх типів клітин, тим самим опосередковуючи транспорт проти градієнтів їх концентрацій за допомогою гідролізу (АТФ) [16, 24]. У нейронах мозку на здійснення активного транспорту іонів проти концентраційного градієнта витрачається до 30 % усього запасу АТФ [2]. Na^+ , K^+ -АТФаза має важливе значення для підтримання осмотичного балансу та цитозольного рН, для формування мембранного потенціалу клітини, модуляції електричної активності збудли-

вих клітинних мембран, транспорту глюкози, амінокислот і медіаторів через мембрану. По суті, Na^+ , K^+ -АТФаза – це інтегральний трансмембранний білок, що вбудований у зовнішню мембрану клітини, із центрами зв'язування для Na^+ і K^+ , а також активним центром зв'язування та гідролізу АТФ.

Нині відомо, що функціональна значимість натрієвого насоса в регуляції судинного тонуусу полягає, з одного боку, у його значному внеску в формування мембранного потенціалу гладеньком'язових клітин [6, 18, 19], а з іншого – в регуляцію внутрішньоклітинного Ca^{2+} [13, 27]. Хоча на сьогодні не викликає сумніву той факт, що Na^+ , K^+ -АТФаза є одним із ланцюгів у системі регуляторних механізмів

мів системи кровообігу, однак до цього часу дослідження здебільшого обмежувались аналізом периферичних механізмів регуляції цієї системи [1, 6, 9, 13, 18, 19, 22, 27, 29, 32].

Як з'ясувалося, Na^+ , K^+ -АТФаза складається із α -, β -, і γ -субодиниць [25], однак у центральній нервовій системі (ЦНС) і серцево-судинній системі виявлена переважно α -субодиниця в трьох ізоформах (α_1 , α_2 і α_3). Саме на неї спрямована дія оубаїну в нейронах ЦНС [25], який традиційно вважається специфічним інгібітором Na^+ , K^+ -АТФази [16, 24]. У наномолярних концентраціях він виявлений у плазмі крові людей і щурів [20]. Внутрішньошлунково введений оубаїн здатний індукувати гіпертензію, пов'язану зі змінами активності та експресії Na^+ , K^+ -АТФази в ЦНС, за допомогою підвищення симпатичного тону, активації церебральної ренін-ангіотензинової системи [8, 10, 20, 28]. Відомо, що ендogenous оубаїн бере участь у контролі натрієвого гомеостазу та регуляції артеріального тиску [8, 31, 32], водночас він модифікує серцеву функцію, а також модулює проліферацію і диференціацію клітин серця [11] та судинних гладеньком'язових клітин [4]. Аспаркам відноситься до лікарських засобів, які використовуються для відновлення електролітного балансу роботи серця, насамперед при гіпокаліємії. Іони магнію активують Na^+ , K^+ -АТФазу, що призводить до зниження внутрішньоклітинної концентрації Na^+ і збільшення надходження K^+ у клітину. Дію аспаркаму як активатора Na^+ , K^+ -АТФази соматичних мембран медулярних нейронів до цього часу не аналізували.

Зважаючи на те, що значення однієї з ключових транспортних систем – Na^+ , K^+ -АТФази для медулярних механізмів регуляції функції кровообігу досліджено недостатньо, мета проведеної роботи полягала у вивченні впливу модуляції активності ензиму на ефекти кардіоваскулярних нейронів, а також біохімічне дослідження активності Na^+ , K^+ -АТФази в довгастому мозку щурів з генетично детермінованою гіпертензією.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на щурах з нормальним артеріальним тиском (контроль) і щурах з генетично детермінованою гіпертензією. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні. Експерименти було виконано згідно з біоетичними вимогами Європейської конвенції про захист тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Тварин наркотизували уретаном (1600 мг/кг, внутрішньоочеревинно). В сонну артерію вводили канюлю для вимірювання системного артеріального тиску (САТ) та його реєстрації за допомогою тензодатчика. Частоту серцевих скорочень розраховували за пульсовими коливаннями артеріального тиску. Після фіксації голови щура в стереотаксичному приладі відкривали поверхню довгастого мозку.

Активність Na^+ , K^+ -АТФази пригнічували мікроін'єкціями її специфічного антагоніста оубаїну (10^{-5} – 10^{-8} моль/л) у медулярні ядра (ядро солітарного тракту – NTS, парамедіанне ретикулярне ядро – PMn, латеральне ретикулярне ядро – LRN). Згідно з координатами стереотаксичного атласу [21] в об'ємі 100–200 нл, а активацію Na^+ , K^+ -АТФази проводили за допомогою ін'єкцій аспаркаму в медулярні ядра, що досліджувалися. Мінімальна терапевтична доза для внутрішньовенного введення аспаркаму 10 мл (на 70 кг маси), отже у щура її еквівалент для внутрішньовенного введення становить близько 40 мкл. Механізм дії аспаркаму пов'язаний із здатністю аспарагіату переносити іони магнію та калію у внутрішньоклітинний простір і брати участь у метаболічних процесах. У 1 мл розчину аспаркаму міститься 0,04 г магнію аспарагіату та 0,01 г калію аспарагіату. Зважаючи на те, що активують Na^+ , K^+ -АТФазу іони магнію, ми проводили розрахунки з урахуванням дози магнію в розчині аспаркаму (в 40 мкл препарату міститься 0,16 мг магнію). Для ін'єкцій розводили 28, 50 і 70 мкл лікарського

засобу фізіологічним розчином. Вміст магнію в ін'єкованому аспаркамі (200 нл) становив 4,5, 8,0 і 11,2 нг.

Для біохімічного визначення активності Na^+ , K^+ -АТФази довгастий мозок, у декапітованих щурів масою 200–250 г видаляли, промивали його охолодженим (2 °С) 0,02 моль/л тріс-НСІ-буфера, рН 7,4. Готували гомогенат у 10-кратному об'ємі середовища (0,25 моль/л сахарози, 0,02 моль/л тріс-НСІ-буфера, рН 7,4) при 2 °С. Для виділення мікросомної фракції гомогенат тканини в 5-кратному об'ємі середовища (0,25 моль/л сахарози, 0,02 моль/л тріс-НСІ-буфера, 1 ммоль/л ЕДТА, рН 7,4) центрифугували спочатку при 11000 г ($r_{\text{сеп}} = 6,5$ см, 15 хв, 2 °С), після чого супернатант центрифугували повторно (48000 г ($r_{\text{сеп}} = 6,0$ см, 50 хв, 2 °С, як описано раніше [1]). Активність Na^+ , K^+ -АТФази визначали в гомогенатах тканини мозку в середовищі (1 мл) такого складу (ммоль/л): тріс-НСІ – 25, MgCl_2 – 5, NaCl – 100, KCl – 10, Na_2ATP – 3; рН 7,4. Вміст білка розраховували за методом Лоурі [1]. Пробу гомогената (100–120 мкг білка) преінкубували протягом 15 хв при 37 °С (рН 7,4) із заданими концентраціями реагентів. Потім вносили інші компоненти середовища для визначення активності ферменту: реакцію починали додаванням Na_2ATP і проводили протягом 10 хв при 37 °С, зупиняли її додаванням Ds-Na до кінцевої концентрації 0,3 %. Активність Na^+ , K^+ -АТФази визначали за приростом неорганічного фосфору (P_i) методом Фіске–Суббароу [1] як різницю між загальною Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФазною активністю і Mg^{2+} -АТФазною активністю і виражали в мікромолях P_i на 1 мкг білка за 1 год. Вірогідних змін Mg^{2+} -АТФазної активності під впливом реагентів, що вивчалися, не було виявлено.

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою критерію t Стьюдента із застосуванням програм Excell (MS office XP) та Origin 6.0 (Microcall Inc., США). Як статистично значимі розглядали міжгрупові відмінності з $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Ефекти пригнічення Na^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран медулярних кардіоваскулярних ядер контрольних щурів ін'єкціями оуабаїну в медулярні ядра. Слід відмітити, що у щурів з нормальним артеріальним тиском ін'єкції оуабаїну (10^{-8} моль/л) у популяції нейронів довгастого мозку, безпосередньо залучених у нервовий контроль функції кровообігу (NTS, PMn і LRN), супроводжувалися переважно підвищенням САТ залежно від дози. Зміни частоти серцевих скорочень здебільшого були незначні, що зумовлено умовами досліду – в основному лівобічними ін'єкціями оуабаїну, але при правобічних ін'єкціях цей показник збільшувався.

Після введення оуабаїну (10^{-8} моль/л) в PMn, LRN і NTS САТ закономірно підвищився в середньому на 12,5, 9,6 і 12,5% відповідно ($P < 0,05$; рис. 1,а, 2,1,2). При збільшенні концентрації препарату до 10^{-5} моль/л гіпертензивна реакція посилювалася, і підвищення цього показника становило 25,4, 17,2 і 20,4 % відповідно ($P < 0,05$). Гіпертензивні реакції на ін'єкції оуабаїну в медулярні ядра мали подібну динаміку. Для них характерним був досить короткий латентний період (у межах 5 с) і швидкий розвиток: САТ максимального підвищувався в середньому через 20 с і тривав 20–30 с, після чого його рівень починав знижуватися. Тривалість реакції становила 3–4 хв.

Отримані нами результати свідчать, з одного боку, про залучення Na^+ , K^+ -АТФази в медулярний контроль функції кровообігу. З другого боку, закономірне підвищення САТ після ін'єкцій специфічного антагоніста Na^+ , K^+ -АТФази оуабаїну в медулярні ядра вказує на те, що пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран нейронів цих ядер може сприяти розвитку гіпертензії центрального генезу.

Ефекти ін'єкцій оуабаїну в медулярні кардіоваскулярні ядра щурів із генетично детермінованою гіпертензією. У щурів із

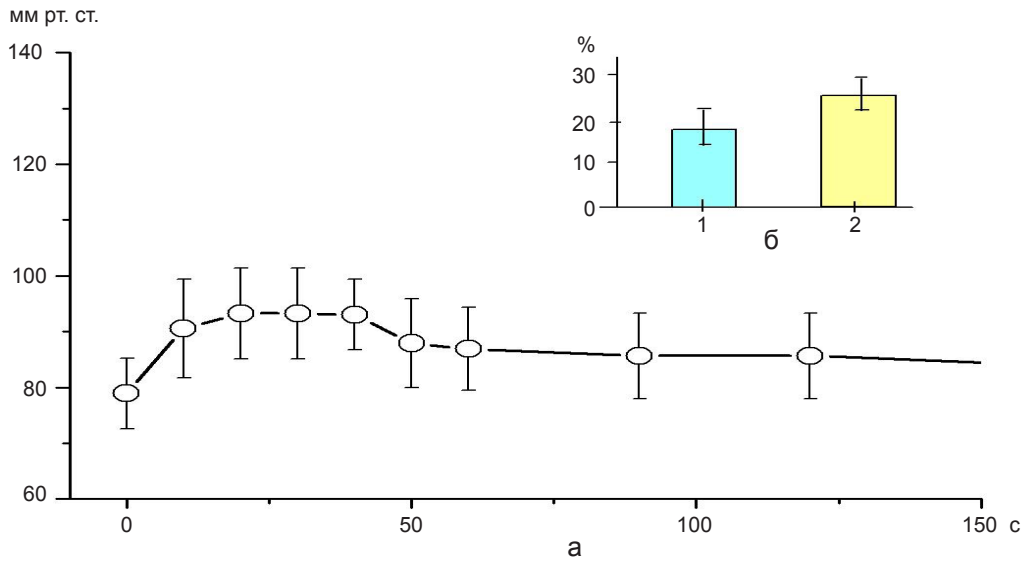


Рис. 1. Зміни системного артеріального тиску (САТ), викликані ін'єкціями інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази оубаїну в парамедіанне ретикулярне ядро контрольних щурів. На а – динаміка САТ; на б – нормовані значення максимальних змін САТ після введення оубаїну в концентрації 10^{-8} моль/л (1) і 10^{-5} моль/л (2)

генетично детермінованою гіпертензією ін'єкції оубаїну (10^{-8} моль/л) в досліджувані медулярні ядра призводили до розвитку гемодинамічних реакцій, які відрізнялися від таких у контрольних щурів. Так, після його введення в РМп у деяких щурів розвивалися гіпертензивні реакції, більш виражені порівняно контролем: підвищення САТ в середньому становило 20,8 % ($P < 0,05$), тобто воно на

8,3 % перевищувало гіпертензивну реакцію у контрольних щурів. З іншого боку, на відміну від контролю, також спостерігався розвиток гіпотензивних реакцій, зниження САТ становило в середньому 17,7 % ($P < 0,05$; рис. 3). Аналогічним чином, ін'єкції оубаїну в LRN і NTS щурів із генетично детермінованою гіпертензією супроводжувалися закономірним зниженням САТ у середньому на 11,4 % ($P < 0,05$)

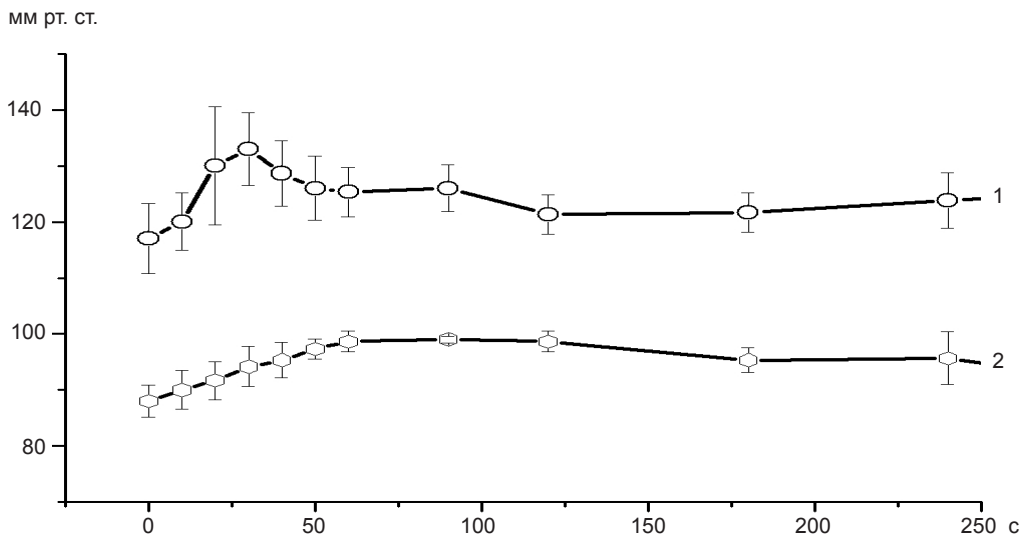


Рис. 2. Зміни системного артеріального тиску, викликані ін'єкціями інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази оубаїну в латеральне ретикулярне ядро (1) і ядро солітарного тракту (2) контрольних щурів

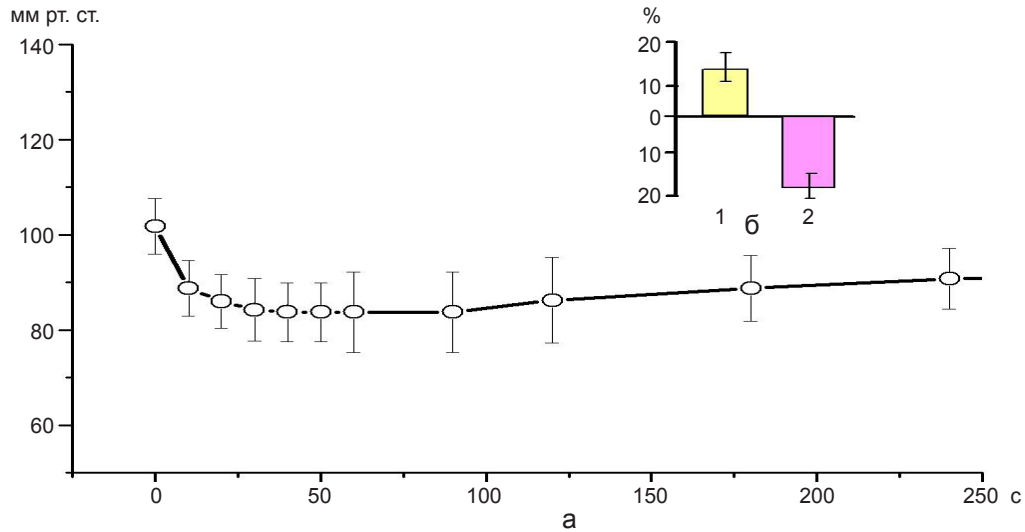


Рис. 3. Особливості змін системного артеріального тиску (САТ), викликаних ін'єкціями інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази оуабайну в парамедіанне ретикулярне ядро щурів із генетично детермінованою гіпертензією. На а – динаміка САТ; на б – нормовані значення максимальних змін САТ після введення оуабайну контрольним щурам (1) і щурам із генетично детермінованою гіпертензією (2)

і 21,1 % ($P < 0,05$; рис. 4). Динаміка САТ була подібною до такої у контрольних щурів.

Отже, у щурів із генетично детермінованою гіпертензією оуабайн, ін'єкований у досліджувані медулярні ядра, на відміну від контрольних щурів, сприяв розвитку

переважно гіпотензивних реакцій, хоча спостерігалися також посилені гіпертензивні реакції. Складається враження, що у щурів із генетично детермінованою гіпертензією оуабайн діє як активатор Na^+ , K^+ -АТФази. Відмінності у його ефектах певною мірою

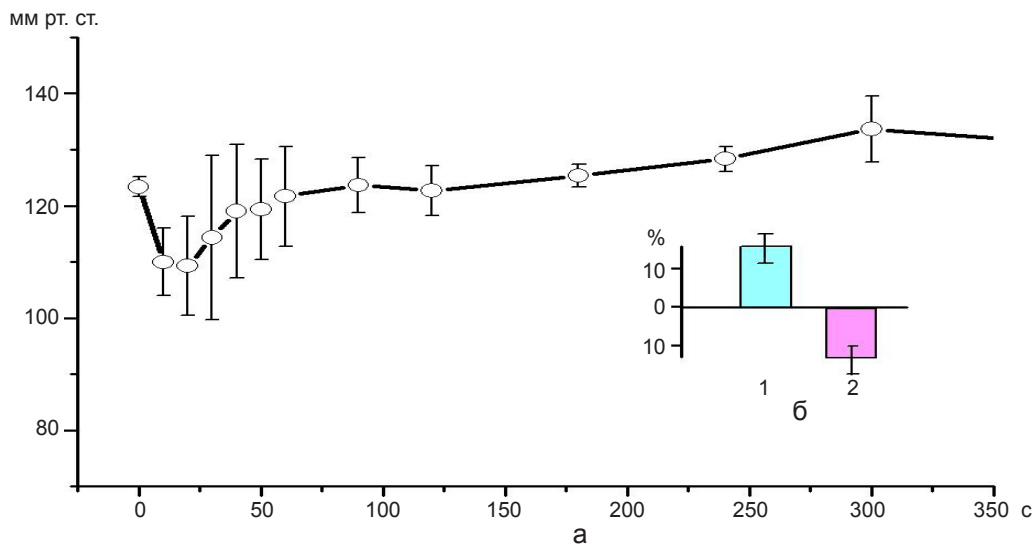


Рис. 4. Особливості змін системного артеріального тиску (САТ), викликаних ін'єкціями інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази оуабайну в латеральне ретикулярне ядро щурів із генетично детермінованою гіпертензією. На а – динаміка САТ; на б – нормовані значення максимальних змін САТ після введення оуабайну контрольним щурам (1) і щурам із генетично детермінованою гіпертензією (2)

можуть бути зумовлені різними експресією та функціональною активністю Na^+ , K^+ -АТФази у контрольних щурів і тварин з генетично детермінованою гіпертензією. Можливо, у останніх в реалізацію гіпотензивних ефектів оубаїну залучені інші механізми. Щоб отримати відповідь на перше припущення, ми визначили активність Na^+ , K^+ -АТФази у контрольних щурів і тварин із генетично детермінованою гіпертензією біохімічними методами.

Визначення активності Na^+ , K^+ -АТФази в довгастому мозку щурів із генетично детермінованою гіпертензією та контрольних тварин. Біохімічними методами показано, що активність Na^+ , K^+ -АТФази в мікосомальній фракції довгастого мозку дорослих щурів із нормальним рівнем САТ становила $(7,82 \pm 1,33)$ мкмоль $\text{P}_i \cdot \text{мг}^{-1} \text{білка} \cdot \text{год}$ ($P < 0,05$), а у тварин із генетично детермінованою гіпертензією активність ферменту в мікосомальній фракції довгастого мозку була $(12,65 \pm 1,30)$ мкмоль $\text{P}_i \cdot \text{мг}^{-1} \text{білка} \cdot \text{год}$, тобто вона значно перевищувала активність ензиму у контрольних щурів (на 61,8 %; $P < 0,05$). У старих щурів активність Na^+ , K^+ -АТФази в мікосомальній фракції довгастого мозку перевищувала таку дорослих щурів ще більше (на 122,6 %; $P < 0,05$).

Отже, отримані результати свідчать про

значні та вірогідні відмінності активності Na^+ , K^+ -АТФази у контрольних щурів і щурів із генетично детермінованою гіпертензією, що може певною мірою пояснювати відмінності у ефектах мікроін'єкцій оубаїну в популяції медулярних нейронів, отримані нами у фізіологічному дослідженні.

Ефекти активації Na^+ , K^+ -АТФази за допомогою ін'єкцій аспаркаму в медулярні ядра контрольних щурів. Як відомо, аспаркам широко використовується в клінічній практиці при порушеннях діяльності серця. Вважають, що Mg^{2+} активує Na^+ , K^+ -АТФазу, сприяючи проникненню іонів калію і магнію у внутрішньоклітинний простір. Можливість впливу аспаркаму на кардіоваскулярні нейрони щурів до цього часу не аналізувалась.

Слід відмітити, що ін'єкції аспаркаму (8,0 нг Mg) в РМп контрольних щурів супроводжувалися закономірним зниженням САТ із стандартним для таких реакцій латентним періодом 5 с, яке розвивалося досить швидко і в середньому становило 15,2 % ($P < 0,05$) через 20 с (рис. 5.1). Реакція мала дозозалежний характер: зниження САТ після введення розчину аспаркаму (11,2 нг Mg) у це ядро було в середньому 20,07 % ($P < 0,05$), гіпотензивна реакція швидше розвивалась, і максимальна

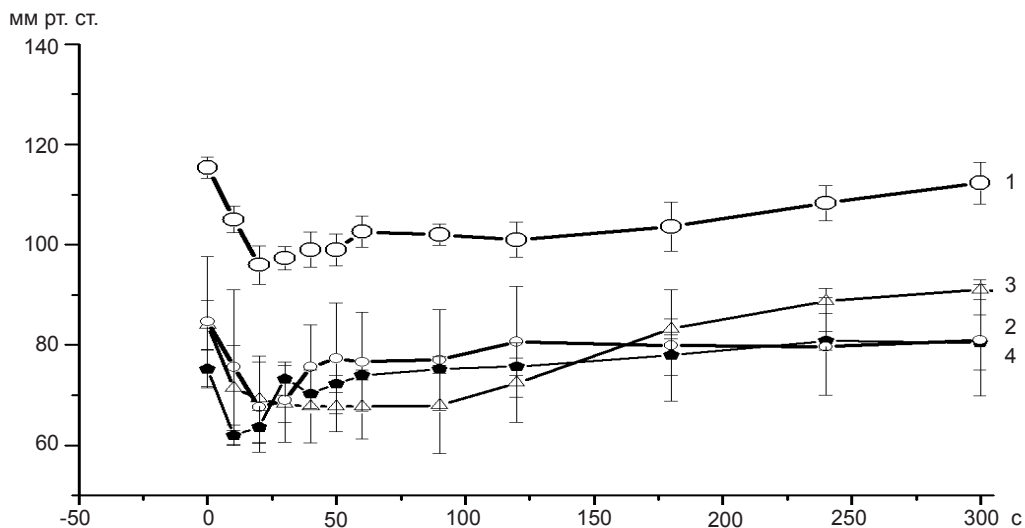


Рис. 5. Зміни системного артеріального тиску (САТ), викликані ін'єкціями активатора Na^+ , K^+ -АТФази аспаркаму в медулярні ядра контрольних щурів: 1, 2 – парамедіанне ретикулярне ядро (8,0 і 11,2 нг магнію відповідно), 3 – латеральне ретикулярне ядро (8,0 нг магнію) і 4 – ядро солітарного тракту (8,0 нг магнію)

відповідь відмічалась у середньому через 10 с. Реакція тривала приблизно 7 хв (див. рис. 5.2).

Ін'єкції аспаркаму (8,0 нг Mg) у NTS контрольних щурів знижували САТ з латентним періодом в межах 5 с, максимум зниження спостерігався в середньому через 30–40 с і становив 19,3 % ($P < 0,05$). Вихідне значення САТ відновлювалося в середньому через 180 с, після чого спостерігалася тенденція до підвищення вихідного рівня САТ з максимумом через 360 с (7,7 %, $P > 0,05$), тривалість реакції в середньому становила 10 хв (див. рис. 5.3).

Введення тієї ж дози препарату в LRN контрольних щурів знижували САТ в середньому на 17,7 % ($P < 0,05$; див. рис. 5.4). Базовий його рівень відновлювався через 90 с, після чого спостерігалася тенденція до його перевищення в середньому на 7,4 % ($P > 0,05$). Реакція тривала приблизно 5 хв.

Таким чином, у контрольних щурів ін'єкції активатора Na^+ , K^+ -АТФази аспаркаму в кардіоваскулярні ядра довгастого мозку призводили до розвитку гіпотензивних реакцій, які були якісно і кількісно подібними. Для них характерною була тенденція до перевищення базового рівня САТ після його повного відновлення.

Ефекти активації Na^+ , K^+ -АТФази за допомогою ін'єкцій аспаркаму в медулярні ядра щурів із генетично детермінованою гіпертензією.

Зважаючи на те, що згідно з біохімічними результатами, Na^+ , K^+ -АТФаза у щурів із генетично детермінованою гіпертензією вже активована порівняно з контрольними щурами, ми ін'єкували аспаркам, який посилює активність ензиму, в досліджувані медулярні ядра в меншій дозі (4,5 нг Mg).

У щурів із генетично детермінованою гіпертензією введення аспаркаму в PMn (4,5 нг Mg) супроводжувалося зниженням САТ в середньому на 10,2 % ($P > 0,05$), яке відмічалось через 10 с, після відновлення вихідного рівня САТ ми спостерігали його подальше підвищення в середньому на 5,5 % ($P < 0,05$; рис. 6.1).

Аналогічним чином, ін'єкції аспаркаму (4,5 нг Mg) в NTS та LRN викликали роз-

виток гіпотензивної реакції. Максимальне зниження САТ спостерігали через 20 с, і воно становило 13,9 та 12,0 % ($P < 0,05$) відповідно (див. рис. 6.2, 3), після відновлення базового рівня САТ, він підвищився в середньому на 3,3 % (див. рис. 6.3). Отже, введення аспаркаму в меншій дозі в медулярні ядра призводило до зниження САТ, яке було дещо менш вираженим, ніж його ефект у контрольних щурів. Як і у них, спостерігалася тенденція до підвищення САТ після повного відновлення його базового рівня. Гіпотензивний ефект аспаркаму посилювався після збільшення дози. Так, його введення в LRN (8,0 нг Mg) супроводжувалося зниженням САТ у середньому на 33,9 % ($P < 0,05$), тобто ефект був більш виражений, ніж у контрольних щурів при введенні аналогічної дози магнію в складі аспаркаму (див. рис. 6.4). Ефект аспаркаму перевищував контрольні значення при його ін'єкціях у всі інші досліджувані ядра довгастого мозку.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що активація Na^+ , K^+ -АТФази соматичних мембран медулярних кардіоваскулярних нейронів за допомогою аспаркаму супроводжується у щурів із генетично детермінованою гіпертензією розвитком гіпотензивних реакцій, як і у контрольних щурів. Динаміка гіпотензивних реакцій тварин обох груп подібна, але у щурів із генетично детермінованою гіпертензією ефект був більш вираженим. Отже, активатори Na^+ , K^+ -АТФази можуть бути використані для попередження та лікування гіпертензивних станів центрального генезу.

ОБГОВОРЕННЯ

Нині з'ясовано, що ендогенний оубаїн продукується в центральній нервовій системі [11], корі надниркових залоз [14] і серці [7]. Вважають, що у гризунів він пригнічує Na^+ , K^+ -АТФазу, зв'язуючись переважно із α_2 і α_3 -ізоформами α -субодиниці ферменту [6], оскільки її α_1 -ізоформа резистентна до оубаїну. Це супроводжується збільшенням

концентрації Na^+ в цитоплазмі, зменшенням активності Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, отже, збільшенням кількості наявного Ca^{2+} для активації скорочення, позитивного інотропного ефекту, підвищення артеріального тиску. В нейронах новонароджених мишей широко експресується α_2 -ізоформа Na^+ , K^+ -АТФази [12, 17], а при її відсутності миші помирають відразу після народження. Нейрони дорослих тварин переважно експресують ізоформу α_3 Na^+ , K^+ -АТФази, яка вважається найбільш чутливою ізоформою α -субодиниці, тому нейрони дуже чутливі до дії оуабайну. При хворобах, що супроводжуються збільшенням ендogenous оуабайну

(гіпертензія [9], серцева недостатність [15] і діабет [5]) збільшення симпатическої активності може бути зумовлене дією агента на центральну ренін-ангіотензинову систему.

На підставі отриманих нами результатів стає очевидним, що нейрональна Na^+ , K^+ -АТФаза бере участь у медулярному нервовому контролі функції кровообігу, а інактивація ензиму супроводжується розвитком гіпертензії центрального генезу, який спостерігали також інші дослідники [8, 10, 11, 28] після введення оуабайну в шлуночки мозку. Наші результати збігаються з даними дослідження Тегуа та співавт. [30], в якому показано,

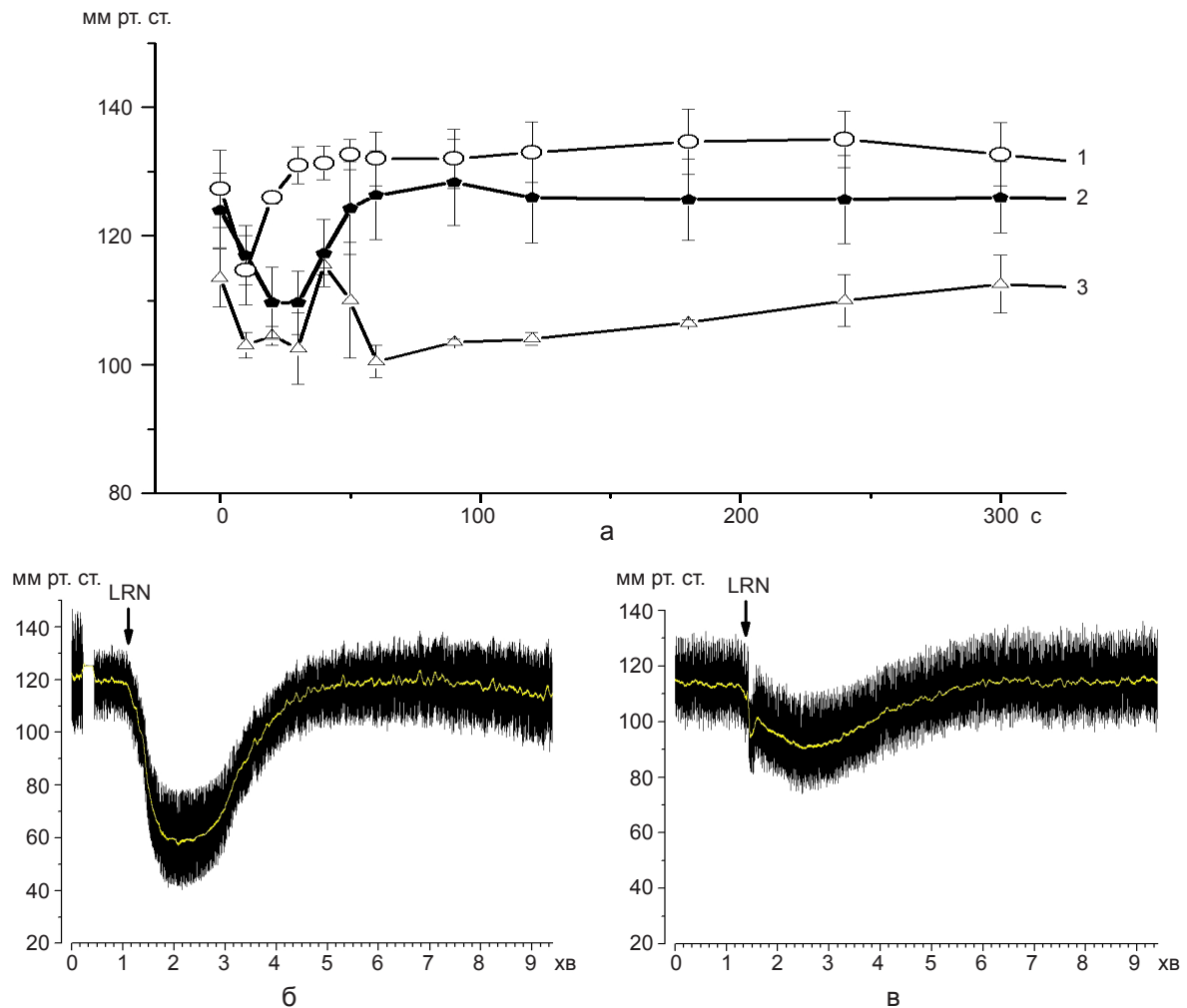


Рис. 6. Особливості змін системного артеріального тиску (САТ), викликаних ін'єкціями аспаркаму в медулярні ядра щурів із генетично детермінованою гіпертензією. На а – динаміка САТ: 1 – парамедіанне ретикулярне ядро, 2 – латеральне ретикулярне ядро, 3 – ядро солітарного тракту; на б, в – оригінальний запис ефекту введення аспаркаму (4,5 і 8,0 мг магнію відповідно) в латеральне ретикулярне ядро

що введення оуабаїну в вентролатеральний відділ довгастого мозку (RVLM) викликає дозозалежне посилення симпатичної нервової активності, підвищення артеріального тиску і збільшення частоти серцевих скорочень. У наших дослідках, його ін'єкції в РМп щурів із генетично детермінованою гіпертензією підвищували САТ, більш виражено порівняно із гіпертензивною реакцією контрольних щурів. Це збігається з висновками Siman та співавт. [26] про посилення ефекту внутрішньовенного введення оуабаїну у щурів із генетично детермінованою гіпертензією внаслідок пригнічення натрієвого насосу. У щурів з викликаною оуабаїном гіпертензією виявлена збільшена тривалість довгострокової потенціації в симпатичних нейронах ізольованого верхнього шийного ганглію, що робить внесок у підвищення симпатичної нервової активності [3]. Однак слід зазначити, що ін'єкції оуабаїну в медулярні нейрони щурів із генетично детермінованою гіпертензією в більшості випадків знижували САТ, на відміну від його ефекту у контрольних щурів і ефектів внутрішньовенного введення препарату щурам із генетично детермінованою гіпертензією. В результаті проведеного нами біохімічного визначення активності Na^+ , K^+ -АТФази в мікросомальній фракції довгастого мозку контрольних щурів та тварин із генетично детермінованою гіпертензією було з'ясовано, що при гіпертензії активність ензиму перевищувала контроль на 61,8 %, тобто фермент уже був активований. Розвиток переважно гіпотензивних реакцій на введення оуабаїну в популяції нейронів довгастого мозку щурів із генетично детермінованою гіпертензією дає підстави думати про можливість активуючого впливу його низьких концентрацій на Na^+ , K^+ -АТФазу медулярних нейронів. Можливо, щурів із генетично детермінованою гіпертензією ефекти оуабаїну на медулярні нейрони реалізуються із залученням інших механізмів. Численні дослідження свідчать, що натрієвий насос є одним із ланцюгів у регуляторних

механізмах системи кровообігу, однак дослідження обмежувалися вивченням периферичних механізмів його регуляції. Зокрема, виявлена роль Na^+ , K^+ -АТФази в регуляції цитозольного Ca^{2+} брадикініном в ендотеліальних клітинах [13], а також у механізмах вазодилаторній дії оксиду азоту (NO) [29]. Нині відомо, що інактивація ензиму підсилює вазоконстрикторний вплив ендотеліну та норадреналіну [22] і знижує ефективність вазодилаторних агентів, насамперед NO [23].

Що стосується центральних ефектів ензиму, то існує інформація, що α_2 -ізоформа Na^+ , K^+ -АТФази відіграє ключову роль у підтриманні гомеостазу Cl^- у респіраторних нейронах [12]. Отже, ефекти Na^+ , K^+ -АТФази в медулярних нейронах можуть бути реалізованими за участю ГАМК-ергічної системи. Надлишок зовнішньоклітинної ГАМК може бути результатом зменшеного кліренсу ГАМК-транспортером, який функціонально пов'язаний із α_2 -ізоформою Na^+ , K^+ -АТФази [12]. Це в свою чергу може призводити до відкриття ГАМК_a-рецепторного каналу. Надлишок внутрішньоклітинного Cl^- може спричинювати переключення відповіді ГАМК від гіперполяризувальної до деполяризувальної [12].

Активация натрієвого насосу супроводжується зниженням концентрації внутрішньоклітинного кальцію, що призводить до релаксації судин [18]. Можна сподіватися, що активация ензиму за допомогою ін'єкцій аспаркаму в досліджувані нами медулярні ядра, яка викликала розвиток гіпотензивної реакції, мала подібний механізм. При цьому, незважаючи на те, що активність Na^+ , K^+ -АТФази у щурів із генетично детермінованою гіпертензією значно більш виражена порівняно із контрольними щурами, її додаткова активация за допомогою ін'єкцій аспаркаму супроводжується більш вираженою дією у контрольних щурів.

Таким чином, проведене нами дослідження дає підстави стверджувати, що стан Na^+ , K^+ -АТФази суттєво впливає на реалізацію нервового контролю функції кровообігу на медулярному рівні ЦНС у нормі і при гіпертензії.

**Л.Н. Шаповал, О.В. Дмитренко, Г.Л. Вавилова,
Л.С. Побегайло, Л.Г. Степаненко,
Н.В. Радченко, Т.Л. Давидовская, В.Ф. Сагач**

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯЦИИ Na^+ , K^+ -АТФАЗЫ НЕЙРОНОВ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА НА ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ У КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Исследование проведено на крысах с нормальным артериальным давлением (контроль) и крысах с генетически детерминированной гипертензией, которые были наркотизированы уретаном (1600 мг/кг массы животного, внутривенно). Показано, что у контрольных крыс инъекции специфического ингибитора Na^+ , K^+ -АТФазы оубаина (10^{-8} – 10^{-5} моль/л) в популяции нейронов продолговатого мозга (ядро солитарного тракта, парамедианное ретикулярное ядро и латеральное ретикулярное ядро) сопровождалось развитием зависимых от дозы гипертензивных реакций. Полученные результаты свидетельствуют о том, что Na^+ , K^+ -АТФаза соматических мембран нейронов продолговатого мозга принимает участие в реализации нервного контроля функции кровообращения, а ее угнетение микроинъекциями оубаина способствует развитию гипертензии центрального генеза. В отличие от крыс с нормальным артериальным давлением, у животных с генетически детерминированной гипертензией инъекции оубаина в исследуемые медуллярные ядра сопровождалась развитием гипотензивных реакций, наряду с гипертензивными. В результате биохимического анализа выявлено, что активность Na^+ , K^+ -АТФазы в микросомальной фракции продолговатого мозга крыс генетически детерминированной гипертензией существенно превышает такую у животных с нормальным уровнем артериального давления. Обсуждаются возможные механизмы эффектов оубаина у крыс с генетически детерминированной гипертензией. Активация Na^+ , K^+ -АТФазы кардиоваскулярных нейронов с помощью инъекций аспаркама в медуллярные ядра сопровождалась развитием гипотензивных реакций у крыс с нормальным артериальным давлением и крыс с генетически детерминированной гипертензией. Таким образом, Na^+ , K^+ -АТФаза соматических мембран медуллярных нейронов играет важную роль в нервном контроле функции кровообращения в норме и при гипертензии.

Ключевые слова: Na^+ , K^+ -АТФаза, оубаин, аспаркам, медуллярные кардиоваскулярные нейроны, крысы генетически детерминированной гипертензией.

**L.N.Shapoval, O.V. Dmitrenko, G.L. Vavilova,
L.S.Pobegaylo L.G.Stepanenko, N.V. Radchenko,
T.L. Davidovskaya, V.F.Sagach**

EFFECT OF THE Na^+ , K^+ -ATPASE MODULATION IN NEURONS OF THE MEDULLA OBLONGATA ON HEMODYNAMIC EFFECTS IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

The study was conducted in normotensive and spontaneously

hypertensive rats anesthetized with urethane (1600 mg / kg of animal weight, intraperitoneally). It has been shown that in normotensive rats, injections of a specific inhibitor of Na^+ , K^+ -ATPase ouabain (10^{-8} – 10^{-5} mol / l) in the populations of the neurons within nucleus of the solitary tract (NTS), paramedian reticular nucleus (PMn) and lateral reticular nucleus (LRN) were accompanied by the development of the hypertensive responses in a dose-dependent fashion. These data suggest that Na^+ , K^+ -ATPase of the neuron somatic membranes in the medullary cardiovascular nuclei is involved in neural control of the cardiovascular function, and its inhibition by microinjections of ouabain promotes the development of hypertension. In contrast to normotensive rats, ouabain injected in the medullary nuclei of spontaneously hypertensive animals induced either enhanced hypertensive or hypotensive responses. Biochemical analysis revealed that the activity of Na^+ , K^+ -ATPase in the microsomal fraction of the medulla oblongata of spontaneously hypertensive rats significantly exceeded its activity in the medulla oblongata of normotensive animals. Possible mechanisms of ouabain effects in spontaneously hypertensive rats have being discussed. Activation of Na^+ , K^+ -ATPase activity of the cardiovascular neurons with aspartame injections in the medullary nuclei resulted in hypotensive responses in both normotensive and spontaneously hypertensive rats.

Key words: Na^+ , K^+ -ATPase, ouabain, aspartame, medullary cardiovascular neurons, normotensive and spontaneously hypertensive rats.

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
National Taras Shevchenko University, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аكوпова О.В., Харламова О.Н., Вавилова Г.Л. Влияние L-аргинина на активность Na^+ , K^+ -АТФазы эндотелия аорты крысы // Биохимия. – 2002. – **67**(9). – С.1277–1281.
2. Болдырев А.А. Роль Na^+ /K-насоса в возбудимых тканях (обзор) // J. Siberian Fed. Univ. Biology. – 2008. – **3**. – С.208–225.
3. Aileru A.A., De Albuquerque A., Hamlyn J.M., Manunta P., Shah J.R., Hamilton M.J., Weinreich D. Synaptic plasticity in sympathetic ganglia from acquired and inherited forms of ouabain-dependent hypertension// Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2001. – **281**(2). – R635–R644.
4. Aydemir-Koksoy A., Abramovitz J., Allen J.C. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**. – P.46605–46611.
5. Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets// Pharmacol. Rev. – 2009. – **61**. – P.9–38.
6. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness// Amer. J. Physiol. – 1993. – **264**. – P.C1367–C1387.

7. D'Urso G., Frascarelli S., Balzan S., Zucchi R., Montali U. Production of ouabain-like factor in normal and ischemic rat heart // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2004. – **43**. – P.657–662.
8. Ferrandi M., Barassi P., Molinari I., Tripodi G., Minotti F., Bianchi G., Ferrari P. Ouabain antagonists as antihypertensive agents // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – **11** (25). – P.3301–3305.
9. Hamlyn J.M., Hamilton B.P., Manunta P. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis // *J. Hypertens.* – 1996. – **14** (2). – P.151–167.
10. Hou X., Theriault S.T., Dostanic-Larson I., Moseley A.E., Lingrel J.B. Enhanced pressor response to increased CSF sodium concentration and to central ANG I in heterozygous α_2 Na⁺, K⁺-ATPase knockout mice // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2009. – **296**. – R1427–R1438.
11. Huang B.S., Leenen F.H. Blockade of brain 'ouabain' prevents sympathoexcitatory and pressor responses to high sodium in SHR // *Amer. J. Physiol.* 1996. – **271**. – Y103–H108.
12. Ikeda K., Onimaru H., Jamada J., Inoue K., Ueno S., Onaka T., Toyoda H., Arata A., Ishikawa T., Taketo M., Fukuda A., Kawakami K. Malfunction of respiratory-related neuronal activity in Na⁺, K⁺-ATPase α_2 subunit-deficient mice is attributable to abnormal Cl⁻ homeostasis in brainstem neurons // *J. Neurosci.* – 2004. – **24** (47). – P. 10693–10701.
13. Laskey R.E., Adams D.J., Johns F., Rubanyi G.M., Van Breemen C. Membrane potential and Na, K pump activity modulate resting and bradykinin-stimulated changes in cytosolic free calcium in cultured endothelial cells // *J. Biol. Chem.* – 1990. – **265**. – P.2613–2619.
14. Laredo J., Hamilton B.P., Hamlyn J.M. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells // *Endocrinology.* – 1994. – **135**. – P.794–797.
15. Leenen F.H., Huang B.S., Yu H, Yuan B. Brain 'ouabain' mediates sympathetic hyperactivity in congestive heart failure // *Circulat. Res.* – 1995. – **77**. – P.993–1000.
16. Lingrel J.B., Kuntzweiler T. Na, K⁺-ATPase // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**. – P.19659–19662.
17. Moseley A.E., Lieske S.P., Wetzel R.K., James P.F. He S., Shelly D.A., Paul K.J., Boivin G.P., Witte D.P., Ramirez J.M. The Na⁺, K⁺-ATPase α_2 isoform is expressed in neurons, and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice // *Ibid.* – 2003. – **278**. – P.5317–5324.
18. Mulvany M.J., Aalkrj C., Petersen T.G. Intracellular sodium, membrane potential, and contractility of rat mesenteric small muscle // *Circulat. Res.* – 1984. – **54**. – P.740–749.
19. O'Donnell M.E., Qwen E. Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle // *Physiol. Rev.* – 1994. – **3**. – P.683–721.
20. Padilha A.S., Salaiques M., Vassallo S.D.V., Batista P.R., Siman F.D.M. Hypertensive effects of the i.v. administration of picomoles of ouabain // *Brazil. J. Med and Biol. Res.* – 2011. – **44**. – P.933–938.
21. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* – New York: Acad. Pres. – 1982. – 360 p.
22. Perez-Vizcaino F., Cogolludo A., Tamargo J. Modulation of arterial Na⁺, K⁺-ATPase-induced [Ca²⁺] reduction and relaxation by norepinephrine, ET-1, and PMA // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **276**. – P H651–H657.
23. Rappaport R.M., Schwartz K., Murad F. Effects of sodium-potassium pump inhibitors and membrane depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta // *Circulat. Res.* – 1985. – **57**. – P.164–170.
24. Scou J.C. The Na, K-pump // *Methods Enzymol.* – 1988. – **156**. – P. 1–25.
25. Shull G.E., Greeb J., Lingrel J.B. Molecular cloning of three distinct forms of the Na⁺-K⁺-ATPase alpha-subunit from rat brain // *Biochemistry.* – 1986. – **25**. – P.8125–8132.
26. Siman F.D., Stefanon I., Vassalio D.V., Padilha A.S. A low concentration of ouabain (0.18 microg/kg) enhances hypertension in spontaneously hypertensive rats by inhibiting the Na⁺ pump and activating the renin-angiotensin system // *Braz. Med. and Biol. Res.* – 2010. – **43**. – P.767–776.
27. Stewart L., Hamilton C., Ingwal J., Naomi S., Graves S., Canessa M., Williams G., Hollenberg N. Vascular smooth muscle response to ouabain: relation to tissue Na⁺ to the contractile response // *Circulat. Res.* – 1993. – **73**. – P.1113–1120.
28. Takahashi H., Yoshika M., Komiyama Yu., Nishimura M. The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain // *Hyperten. Res.* – 2011. – **34**. – P. 1147–1160.
29. Tamaoki J., Tagaya E., Nishimura K., Isono K., Nagai A. Role of Na⁺, K⁺-ATPase in cyclic GMP-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells // *Brit. J. Pharmacol.* – 1997. – **122**. – P.112–116.
30. Teruya H., Yamazato M., Muratani H., Sakima A., Takishita S., Terano Y., Fukiyama L. Role of ouabain-like compound in the rostral ventrolateral medulla in rats // *J. Clin. Invest.* – 1997. – **99**. – P.2791–2798.
31. Wang J.C., Staessen J.A., Messaggio E., Nawrot T., Fagard R., Hamlyn J.M., Bianchs G., Manunta P. Salt, endogenous ouabain and blood pressure interactions in the general population // *J. Hypertension.* – 2003. – **21**(8). – P. 1475–1481.
32. Zhang J., Lee M.Y., Cavalli M., Chen L., Berra-Romani R., Balke CW, Bianchi G., Ferrari P., Hamlyn JM, Iwemoto T, Lingren JB, Mattesion DR, Willer WG, Blaustein MP. Sodium pump alpha 2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice // *J. Physiol.* – 2005. – **569** (Pt1). – P. 243–256

Ин-т фізіології ім.О.О. Богомольця НАН України, Київ;

Нац. ун-т імені Тараса Шевченка, Київ

E-mail: shapoval@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 10.04.2012