

## ФЕРМЕНТАТИВНО-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ NO-ДОНОРНОЙ АКТИВНОСТИ НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ В АОРТЕ КРЫСЫ

И. Н. ЯКОВЕНКО, В. В. ЖИРНОВ

*Институт биоорганической химии и нефтехимии Национальной академии наук Украины, Киев;  
e-mail: kuksanik@mail.ru*

*Вивчено механізми NO-опосередкованої фізіологічної активності нітропруссиду натрію (НПН) в ізольованих сегментах аорти щура. Виявлено, що в попередньо оброблених 1,5 мМ NaCN сегментах аорти НПН зумовлює невелику вазоконстрикцію. Окислювач гемових груп  $K_3Fe(CN)_6$  помітно пригнічує індуковану НПН вазодилатацію. Також показано, що NaCN інгібує накопичення  $NO_2^-$ , яке спостерігається в буферному розчині з НПН після додавання одержаних із гомогенатів аорти щура мікросомних мембран. Обговорюється значення гемвмістних ферментів мембран клітин для виявлення NO-донорної активності НПН та можливість участі вивільнюваних НПН іонів CN у пригніченні індукованої НПН вазодилатації.*

*К л ю ч о в і с л о в а: оксид азоту, ціанід, нітропруссид натрію, донори оксиду азоту, гладенький м'яз судини.*

**И**з-за короткого периода полураспада оксида азота (NO) для изучения биологической активности этого свободного радикала часто используются так называемые NO-доноры, освобождающие NO спонтанно или путем ферментативного превращения. Несмотря на наличие в литературе данных о необходимости метаболического превращения используемого в клинике вазодилатора нитропруссид натрия (НПН) для проявления его NO-донорной активности [1], некоторые исследователи неоправданно относят НПН к прямым донорам NO [2]. На наш взгляд, это может быть вызвано возможностью освобождения NO и  $CN^-$  путем фотохимической активации НПН [3]. Однако известно, что в отсутствие света и биологических структур НПН не высвобождает NO [4].

Одновременно с NO НПН освобождает также ионы цианида [4]. В литературе описаны случаи суицида приемом НПН, что в конечном итоге было обусловлено острым отравлением цианидом [5]. При лечении спазмов мозговых сосудов нитропруссидом для снижения его токсичности предложено комбинированное введение НПН с антидотом цианида — тиосульфатом [6]. Целью данной работы было изучение механизмов NO-донорной активности НПН и изменения вазоактивных свойств НПН в аорте крысы в присутствии NaCN. В наших исследованиях мы впервые обнаружили, что в предварительно активированных фенолэфрином и затем обработанных цианидом натрия (1,5 мМ) сегментах аорты крысы НПН не только теряет свои вазодила-

тирующие свойства, но и вызывает небольшую вазоконстрикцию.

### Материалы и методы

Кольцевые сегменты грудного отдела аорты крысы диаметром 2,5 мм и длиной 2 мм фиксировались изометрически в камере с физиологическим раствором Кребса между стальным стационарным крюком и изометрическим преобразователем, который соединен с самописцем (TZ 213S, «Laboratorní přístroje», Чешская Республика). Эксперименты проводились в темноте при 37 °С в модифицированном растворе Кребса, содержащем (в мМ): NaCl — 133; KCl — 4,7;  $CaCl_2$  — 2,5;  $MgCl_2$  — 1,2;  $NaHCO_3$  — 10;  $NaH_2PO_4$  — 1,38; глюкозу — 7,8;  $Heperes$  — 10 (рН 7,4). Сегменты аорты предварительно сокращали фенолэфрином (10 мкМ) и затем инкубировали в присутствии исследуемых соединений до выхода показаний на устойчивое плато перед добавлением НПН.

Микросомные мембраны выделяли из гомогенатов аорты крысы и затем изучали NO-донорную активность НПН в присутствии микросом путем определения количества  $NO_2^-$  реактивом Грисса [1]. Инкубацию НПН с микросомами проводили в темноте при 37 °С в среде, которая содержала (в мМ): сахарозу — 250; глутатион — 1; NADH — 0,1; НПН — 0,1; Mops — 20 (рН 7,0). В серии экспериментов в реакционный раствор дополнительно вносили NaCN.

В работе использовали фенолэфрин, феррицианид калия, Mops,  $Heperes$ , NADH, глутатион, N-(1-нафтил)-этилендиамин дигидрохлорид,

сульфаниламид, NaCN, нитропруссид натрия («Sigma», США). Остальные реактивы были марки х.ч. отечественного производства.

Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка ( $M \pm m$ ). Для статистической оценки использовали *t*-критерий Стьюдента для выбранного уровня значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена типичная динамика изменения тонуса преактивированных фенилэфрином изолированных сегментов аорты крысы под действием 1,5 мМ NaCN. В литературе отмечено, что при данной концентрации цианида и выше происходит полное ингибирование поглощения кислорода изолированными сосудами и в этих условиях наблюдаемая небольшая вазорелаксация вызвана блокадой дыхательной цепи митохондрий [7]. Можно было ожидать, что на фоне NaCN действие НПН на сосуды должно сопровождаться еще большим падением их тонуса. Однако в присутствии 1,5 мМ NaCN НПН не только не вызывает дальнейшего расслабления сосудистых сегментов, но даже приводит к их сокращению (рис. 1, 2).

В литературе отмечено подавление цианидом НПН-вазорелаксации [8], однако НПН-вазоконстрикцию предварительно обработанных NaCN сосудов мы наблюдали впервые. Это, возможно, связано с использованием нами более высоких доз NaCN, достаточных для ингибирования ферментов, участвующих в биотрансформации НПН. Феномен НПН-вазоконстрикции обработанных цианидом сосудов может объясняться NO-независимыми эффектами НПН, когда полностью блокированы NO-опосредованные эффекты НПН. В литературе отмечена возможность NO-независимого подавления проницаемости Ca<sup>2+</sup>-каналов гранулярных клеток мозжечка крысы под действием НПН, которая может быть обусловлена эффектами исключительно ферроцианидной части молекулы НПН [9]. Также описана NO-независимая активация K<sup>+</sup>-каналов при действии НПН на эпителий почек крысы [10].

Известно, что основным эффектором NO является растворимая гуанилатциклаза (sGC), которая активируется путем нитрозирования SH групп и/или связывания NO с гемом активного центра фермента [11]. Используя ингибиторы sGC, в настоящее время также изучаются так называемые sGC-независимые эффекты NO, обусловленные прямым действием NO на другие ферменты и ионные каналы клеток [12]. В литературе отмечено смещение зависимости величины запускаемой НПН вазорелаксации аорты крысы после обработки ингибитором sGC 6-анилин-

5,8-квинолинквиноном (LY83583) в сторону больших доз НПН [13]. Другой, используемый в настоящее время ингибитор sGC 1*H*-[1,2,4]оксодиазол[4,3,-*a*]квиноксалинон-1 (ODQ), снижает также и величину НПН-вазорелаксации этого сосуда [11]. Хотя в этом случае ODQ, помимо ингибирования sGC, может также неспецифически подавлять активность участвующих в метаболической активации НПН цитохром *P*-450 монооксигеназ, что описано другими исследователями [14]. Все это указывает на то, что обнаруженный вазоконстрикторный эффект НПН вряд ли может быть вызван возможной полной блокадой sGC цианидом.

Как показано на рис. 3, введение 0,1 мМ НПН в буферный раствор, содержащий выделенные из гомогенатов аорты крыс микросомы, сопровождается появлением продукта окисления NO нитрита. Без добавления микросом, в контрольных растворах с НПН, накопления нитрита не отмечается. Дополнительное введение в инкубационный раствор 0,15 мМ NaCN снижает, а 1,5 мМ NaCN полностью подавляет накопление нитрита в растворах с НПН. Полученные данные свидетельствуют о метаболической активации НПН и освобождении NO микросомальными ферментами, которые полностью ингибируются лишь сравнительно высокими дозами цианида.

В отличие от цианида, окислитель гемовых

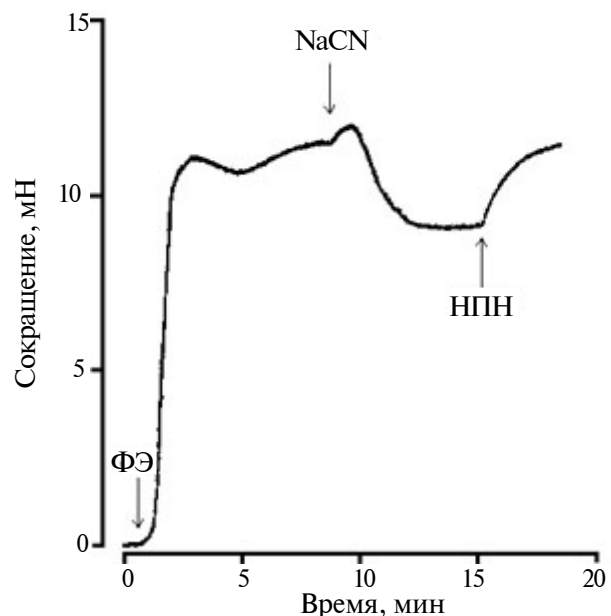


Рис. 1. Типичная динамика сокращения изолированных сегментов аорты крысы после добавления 5 мкМ НПН на фоне воздействия 1,5 мМ NaCN. Сегменты сосудов предварительно сокращали фенилэфрином (ФЭ, 10 мкМ). Стрелками обозначены моменты добавления веществ.

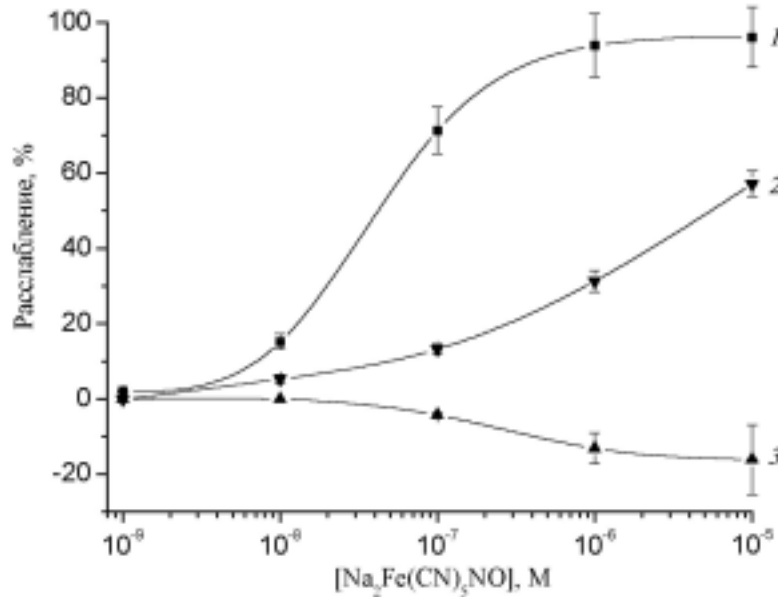


Рис. 2. Действие НПН на тонус предварительно сокращенных фенилэфрином (10 мкМ) изолированных сегментов аорты крысы в контроле (1) и после добавления 0,5 мМ  $K_3Fe(CN)_6$  (2) или 1,5 мМ  $NaCN$  (3). Данные ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ ) рассчитаны как процент от сокращения, вызываемого фенилэфрином (10 мкМ).

групп  $K_3Fe(CN)_6$  (феррицианид калия) не вызывает НПН-вазоконстрикцию в аорте крысы, но заметно снижает величину НПН-вазодилатации (рис. 2). Как известно,  $K_3Fe(CN)_6$  не проникает через клеточные мембраны и обычно используется как внеклеточный ингибитор трансмембранной системы транспорта электронов [15]. В клетках кровеносных сосудов описана такая электрон-транспортная система, в состав которой входят мембраносвязанные NADH оксидоредуктазы, способные восстанавливать различные субстраты, перенося электроны от внутриклеточного NADH [16]. Также известно, что в случае восстановления НПН происходит его распад с появлением копродуктов реакции NO и  $CN^-$  [1]. Обнаруженное нами влияние феррицианида на НПН-вазодилатацию может быть вызвано конкуренцией этого агента с НПН за места связывания выше отмеченных NADH оксидоредуктаз и электроны, необходимые для восстановления НПН и освобождения NO. Хотя, в отличие от  $K_3Fe(CN)_6$ , нам не удалось найти сведений о проницаемости клеточных мембран для  $Na_2Fe(CN)_5NO$  (нитропруссид). Полученные нами данные свидетельствуют о большой роли клеточной мембраны в ферментативном превращении НПН. Возможно, это связано с ограниченной внутриклеточной проницаемостью НПН. Следует заметить, что  $K_3Fe(CN)_6$ , аналогично действию НПН в присутствии  $NaCN$ , вызывает небольшую вазоконстрикцию преактивированных фенилэфрином сегментов аорты. Данное сходство эффектов

$K_3Fe(CN)_6$  и НПН на сосудистый тонус может быть обусловлено наличием общих элементов молекулярного строения этих веществ.

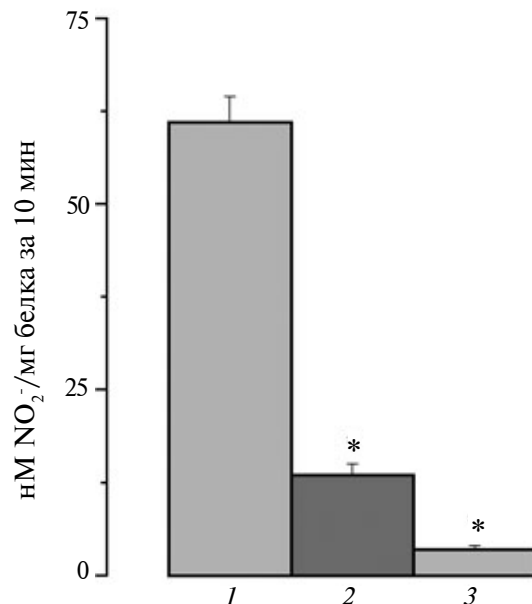


Рис. 3. Продукция  $NO_2^-$  в буферном растворе, содержащем изолированные из гомогенатов аорты крысы микросомы спустя 10 мин после введения 0,1 мМ НПН в контроле (1) и при добавлении 0,15 мМ (2) или 1,5 мМ  $NaCN$  (3). \*Достоверные различия ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ) по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в биосистемах освобождение NO из нитропруссиды происходит с участием гемсодержащих ферментов, в том числе связанных с клеточной мембраной. Таким образом, НПП является непрямым донором NO. Накопление цианида, которое наблюдается при метаболическом превращении НПП [4–6], может понижать дальнейшую NO-донорную активность НПП и величину НПП-вазорелаксации и даже вызывать обусловленный НПП вазоконстрикторный эффект. Это необходимо учитывать, применяя НПП как лекарственное средство для снижения кровяного давления.

**AN ENZYME-MEDIATED MECHANISM OF SODIUM NITROPRUSSIDE NO-DONATING ACTIVITY IN THE RAT AORTA**

*I. N. Iakovenko, V.V. Zhirnov*

Institute of Bioorganic and Petroleum Chemistry,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: kuksanik@mail.ru

**S u m m a r y**

The mechanisms of NO-mediated physiological activity of sodium nitroprusside (SNP) have been investigated in isolated rat aorta segments. It was shown, that in pretreated with 1.5 mM NaCN aorta segments SNP causes slight vasoconstriction. Heme-oxidizer  $K_3Fe(CN)_6$  markedly suppressed SNP-induced vasodilatation. Also it was revealed that NaCN inhibits  $NO_2^-$  accumulation, which was observed in buffer solution with SNP after addition of microsomal membranes isolated from rat aorta homogenates. The great importance of cell membranes heme-containing enzymes for display of SNP NO-donating activity and the possibility of SNP-released  $CN^-$  involvement in suppression of SNP-induced vasodilatation is discussed.

**К е у w o r d s:** nitric oxide, cyanide, sodium nitroprusside, nitric oxide donors, vascular smooth muscle.

1. Mohazzab-H. K. M., Kaminski P. M., Agarwal R., Wolin M. S. // *Circ. Res.* 1999. **84**, N 2. P. 220–228.
2. Ignarro L. J., Napoli C., Loscalzo J. // *Ibid.* 2002. **90**, N 1. P. 21–28.
3. Arnold W. P., Longnecker D. E., Epstein R. M. // *Anesthesiology.* 1984. **61**, N3. P. 254–260.
4. Bates J. N., Baker M. T., Guerra Jr. R., Harrison D. G. // *Biochem. Pharmacol.* 1991. **42**, suppl. P. S157–S165.
5. Frolidi R., Cingolani M., Cacaci C. // *J. Forensic Sci.* 2001. **46**, N 6. P. 1504–1506.
6. Thomas J. E., McGinnis G. // *Stroke.* 2002. **33**, N 2. P. 486–492.
7. Coburn R. F., Grubb B., Aronson R. D. // *Circ. Res.* 1979. **44**, N 3. P. 368–378.
8. Rapoport R. M., Murad F. // *Eur. J. Pharmacol.* 1984. **104**, N 1–2. P. 61–70.
9. Kiedrowski L., Costa E., Wroblewski J. T. // *Mol. Pharmacol.* 1992. **41**, N 4. P. 779–784.
10. Hirsch J. R., Cermak R., Forssmann W. G. et al. // *Kidney Int.* 1997. **51**, N2. P. 473–476.
11. Tseng C.-M. L., Tabrizi-Fard M. A., Fung H. L. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. **292**, N 2. P. 737–742.
12. Wanstall J. C., Homer K. L., Doggrel S. A. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2005. **3**, N 1. P. 41–53.
13. Malta E., Macdonald P. S., Dusting G. J. // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1988. **337**, N 4. P. 459–464.
14. Feelisch M., Kotsonis P., Siebe J. et al. // *Mol. Pharmacol.* 1999. **56**, N 2. P. 243–253.
15. Crane F. L., Sun I. L., Clark M. G. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. **811**, N 3. P. 233–264.
16. Mohazzab-H. K. M., Wolin M. S. // *Am. J. Physiol.* 1994. **267**, N 6. P. L823–L831.

Получено 27.04.05