

УДК 616.831-009.11-053-079

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ - ВОЗМОЖНОГО ДОНАТОРА ОКСИДА АЗОТА НА АКТИВНОСТЬ АТРаЗ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ДЕТЕЙ.

*Е.М. Васильева, М.И. Баканов, Х.М. Марков, В.В. Алатырцев,
Т.К. Малышко, Т.В. Терехова*

ГУ Научный центр здоровья детей РАМН, 117963, Москва, Ломоносовский пр.2/62

Исследовали влияние нитропруссид натрия - возможного донора сигнальной молекулы - оксида азота на активность Ca^{2+} , Mg^{2+} - и Na^+ , K^+ -АТРаЗ и интенсивность перекисного окисления липидов эритроцитов *in vitro*. Установлено, что под влиянием нитропруссид почти в 3 раза (по сравнению с контролем) увеличиваются как механический гемолиз, так и перекисный гемолиз эритроцитов, а также содержание связанного малонового диальдегида. Параллельно в эритроцитах возрастала активность Na^+ , K^+ -АТРаЗы.

Ключевые слова: Оксид азота, эритроциты, нитропруссид натрия, перекисное окисление липидов, АТРаЗы.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что оксид азота может играть существенную роль во многих защитных реакциях организма. Установлено, что клеточные элементы крови, в том числе эритроциты, являются активными в метаболизме NO [1]. Ранее нами было выявлено, что L-аргинин, изменяя синтез NO, влияет на активность АТРаЗ и перекисное окисление липидов в эритроцитах [2]. В ряде работ нам встречались ссылки на роль нитропруссид натрия как возможного донатора NO [3, 4]. Однако исследования возможного механизма действия нитропруссид натрия в этих работах не проводилось.

В данной работе мы исследовали влияние нитропруссид натрия, препарата применяемого в терапевтической практике, на активность некоторых ионтранспортных АТРаЗ и перекисное окисление липидов в эритроцитах.

МЕТОДИКА. В работе использовали эритроциты детей, обследованных в лаборатории клинической биохимии в связи с основным заболеванием (7 больных были от 1 до 4 лет с неврологической патологией и 7 человек от 5 до 15 лет со сколиозом). Кровь собирали в гепаринизированные пробирки, плазму отделяли центрифугированием, эритроциты дважды промывали охлаждённым 0,85% раствором NaCl. Осаждённые эритроциты суспендировали в физиологическом растворе и немедленно использовали. Нитропруссид натрия использовали в конечной концентрации его в суспензии эритроцитов 0,01 мкМ (2,98 мкг/л; по фармакологическим справочникам его максимальная разовая доза – до 8 мкг/кг). Эритроциты выдерживали при комнатной температуре, в темноте 30 минут, после этой предварительной инкубации суспензию делили на две части, в одной исследовалась активность АТРаЗ, в другой – перекисные процессы. При определении активности ферментов использовали среды содержащие: 30 мМ имидазол, 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3,0 мМ MgCl_2 , 1 мМ Na_2ATP . Об активности

ферментов судили по приросту неорганического фосфата (после 40 минутной инкубации при 37°C) в отсутствие (общая АТРаза) или в присутствии 3 мМ уабаина (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза), по разности между ними рассчитывалась активность Na^+ , K^+ -АТРаза. Перекисные процессы изучались скрининг методом определения интенсивности метаболических процессов в мембране эритроцита [5]. При этом исследовались: механический (МГ) и перекисный (ПГ) гемолиз эритроцитов, процент прироста гемолиза эритроцитов, уровень связанного и свободного малонового диальдегида (МДА), способность клеток к деградации МДА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Под влиянием нитропруссид натрия почти в 3 раза (по сравнению с контролем) увеличиваются как МГ, так и ПГ эритроцитов, что свидетельствует о повышении хрупкости мембран и интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [5]. Имелась тенденция к снижению процента прироста гемолизированных эритроцитов.

В обработанных нитропруссидом клетках увеличивалось, содержание связанного ($p < 0,05$) и не изменялся уровень свободного МДА (см. табл). Повышение содержания связанного МДА может быть результатом как активации ПОЛ, что подтверждается увеличением МГ и ПГ, так и усилением связывания МДА клеткой. Можно предположить также ингибирование нитропруссидом натрия активности альдегиддегидрогеназы, участвующей в метаболизме МДА в эритроцитах [5].

Таблица. Влияние нитропруссид натрия на активность АТРаза (мкмоль Фн/10¹² эритроцитов) и перекисные процессы (нмоль/10⁶ эритроцитов).

Показатель	Контроль (n=14)	Нитропруссид натрия (n=14)	Феррицианид (n=5)
МГ (%)	3,18±0,63	9,11±2,85*	22,2±6,8*
ПГ (%)	3,52±0,64	9,52±2,82*	19,9±5,7*
% прироста	119,3±8,0	112,3±7,5	112,1±6,6
МДА связанный	2,16±0,16	2,78±0,26*	5,08±0,89**
МДА свободный	0,95±0,14	0,93±0,25	11,0±1,52**
Ca,Mg-АТФаза	428,6±41,3	401,5±70,6	450±73,2
Na,K-АТФаза	111,0±26,6	255,9±86,2	209,1±80,1

Примечание. Значимость различий по сравнению с контролем: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Параллельно в эритроцитах возрастала активность АТРаза, главным образом за счёт увеличения активности Na^+ , K^+ -АТРаза, но из-за большого разброса данных это увеличение не было статистически значимым. С целью выяснения причин большого разброса данных, мы разделили обследованных детей по возрастам. Оказалось, что влияние нитропруссид натрия на активность Na^+ , K^+ -АТРаза зависит от возраста. В эритроцитах детей до 6 лет нитропруссид вызывал снижение активности данного фермента на 12%, а в эритроцитах детей старше 12 лет - приводил к повышению активности Na^+ , K^+ -АТРаза почти на 100%. Кроме того, под влиянием этого препарата в эритроцитах детей младшего возраста наблюдалась тенденция к снижению как МГ, так и ПГ, а в старшей возрастной группе – резкое увеличение и того, и другого, что может свидетельствовать либо о недостаточности субстратов ПОЛ у детей младшей возрастной группы, либо о повышенной антиоксидантной активности их эритроцитов [5].

В контроле выявлена отрицательная корреляционная зависимость активности АТРаза от содержания свободного МДА $r = -0,57$ (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза), $r = -0,55$ (Na^+ , K^+ -АТРаза) соответственно. Добавление нитропруссид натрия снижало выраженность корреляционных связей свободного МДА / Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза до $r = -0,4$. Оставалась неизменной корреляционная зависимость активности Na^+ , K^+ -АТРаза от содержания свободного МДА $r = -0,51$.

Поскольку резкое увеличение МГ, как и снижение процента прироста гемолизированных эритроцитов, в результате индуцированного ПГ – явление

неблагоприятное для клеток, мы предположили, что интенсификация МГ может быть связана не только и не столько с высвобождением NO при распаде молекул нитропруссидов, сколько с токсическим действием его циангруппы. Для проверки этого предположения мы провели изучение влияния раствора феррицианида калия на эритроцит. Поскольку в нитропруссид входит 5 групп CN, а в феррицианид – шесть, количество феррицианида, вводимого в пробу, пересчитывали на CN группы. Установлено, что действие феррицианида идентично таковому нитропруссидов, но более выражено. Под воздействием феррицианида в 9 раз по сравнению с контролем ($p < 0,01$) возрастали как МГ, так и ПГ, резко возрастало содержание всех видов МДА. Наблюдалось более чем двухкратное увеличение МГ и ПГ. Возможно, что NO, образующийся при введении нитропруссидов натрия, в какой-то мере защищает клетки от токсического действия CN групп, но эта защита явно недостаточна, учитывая резкое увеличение гемолиза эритроцитов особенно механического, что свидетельствует об интенсификации перекисных процессов. Это подтверждается и повышением уровня МДА. Феррицианид вызывал резкий прирост содержания всех видов МДА, содержание наиболее токсичного – свободного МДА возрастало в 10 раз ($p < 0,001$) как по сравнению с контролем, так и по сравнению с нитропруссидом. Достоверно по сравнению с нитропруссидом (но менее выражено) увеличивалось и содержание связанного МДА ($p < 0,05$).

Добавление феррицианида к клеточной суспензии приводило к исчезновению корреляционных связей между содержанием МДА и активностью Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, и снижало выраженность корреляционных связей с активностью Na^{+} , K^{+} -АТФазы до $r = -0,4$.

Вероятно, при использовании нитропруссидов в клинике целесообразно применение антиоксидантов для снятия токсических эффектов CN групп.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Wennmalm A., Benthin G., Edlund A., et al (1993) Circ.Res., **73**, 1121-1127.
2. Васильева Е.М., Марков Х.М., Баканов М.И. (1999) Бюлл. эксп. биол. и мед., № 9, 321-325.
3. Nakaki T. (1994) Keio. J. Med., **1**, 15-26.
4. Star R.A. (1993) Am.J. Medical sci., **306**, 348-358.
5. Банкова В.В. (1990) Автореф. дисс. д.б.н., М. 38с.

Поступила: 09. 12. 2002

THE INFLUENCE OF SODIUM NITROPRUSSIDE, THE POSSIBLE DONOR OF NITRIC OXIDE ON ACTIVITY ATPASES AND LIPID PEROXIDATION OF ERYTHROCYTES OF SICK CHILDREN.

*E.M Vasiljeva, M.I. Bakanov, Ch.M. Markov, V.V. Alatircev,
T.K. Malishko, T.V.Terechova*

Scientific Center of Children's Health , Russian Academy of Medical Science, Moscow
Lomonosovskii pr.2/62, Moscow, 117963, Russia

The effect of sodium nitroprusside, possible nitric oxide donor, on the activities of Ca^{2+} , Mg^{2+} - and Na^{+} , K^{+} -ATPases and lipid peroxidation was investigated in erythrocytes *in vitro*. Sodium nitroprusside caused 3-fold increase of mechanical and peroxidative erythrocyte hemolysis and also increase of bound malonic dialdehyde. Sodium nitroprusside-treated erythrocytes were also characterized by increased Na^{+} , K^{+} -ATPase activity.

Key words: nitrogen oxide, erythrocyte, sodium nitroprussid, and lipids peroxidation, ATPases.