

# Ендотеліальний моноцитаактивуючий фактор II відновлює ендотелійзалежне розслаблення судин при старінні

К.О. Драчук, Ю.П. Коркач, Н.О. Дорофєєва, О.І. Корнелюк<sup>1</sup>, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ; e-mail: 8701dk@ukr.net

*Вивчали вплив ендотеліального моноцитаактивуючого фактора II (EMAP II) на розслаблення гладеньких м'язів (ГМ), показники оксидативного стресу та конститутивний синтез оксиду азоту (NO) у старих щурів. Встановили посилене утворення вільних радикалів кисню. Наслідком цього було неспряження (uncoupling) стану конститутивної NO-синтази (cNOS) і зниження синтезу NO. Результатом цих біохімічних процесів стало порушення ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти, амплітуда якого становила  $7,5 \pm 1,4\%$  порівняно з  $64,9 \pm 3,5\%$  у дорослих тварин. Встановлено, що EMAP II суттєво пригнічував оксидативний стрес, відновлював спряжений стан cNOS та збільшував конститутивний синтез NO. Це сприяло відновленню ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти старих щурів, амплітуда якого збільшувалася до  $66,6 \pm 6,8\%$ .*

*Ключові слова: ендотеліальний моноцитаактивуючий фактор II; старіння; ендотелійзалежне розслаблення; оксидативний стрес; оксид азоту.*

## ВСТУП

Оксид азоту (NO) – ключовий фактор, що забезпечує фізіологічну реалізацію ендотелійзалежного розслаблення. Основним шляхом синтезу NO в судинах є окисний метаболізм L-аргініну під дією кальційзалежної конститутивної NO-синтази (cNOS). Цей фермент активується при дії хімічних факторів (ацетилхолін, брадикінін, естрогени, інсулін та ін.) або при збільшенні “напруження зсуву”. Синтезований в ендотелії NO дифундує в гладенькі м'язи (ГМ), активує гуанілатциклазу і збільшує утворення циклічного гуанозин-монофосфату (цГМФ). У результаті активується цГМФ-залежна протеїнкіназа, яка стимулює відтік внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  і розслаблення ГМ [1]. Існують докази і про прямий релаксуючий вплив NO на ГМ, при якому відбувається цГМФ-незалежна активація  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази саркоплазматичного ретикулула і зменшення вмісту цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [2].

Головною причиною порушення ендотелійзалежного розслаблення є зменшення конститутивного синтезу NO, що призводить до зниження його біодоступності. Останнє виникає через послаблення синтезу вазорелаксанта та/або посилення його деградації, зокрема, при оксидативному стресі [3]. Пошук шляхів корекції ендотелійзалежного розслаблення зосереджений головним чином на засобах посилення синтезу NO і пригнічення утворення активних форм кисню в тканинах серцево-судинної системи. Однією із речовин, що потенційно відповідає вказаним вимогам є ендотеліальний моноцитаактивуючий фактор II (EMAP II). Нещодавно було показано, що він покращує діастолічну функцію серця при артеріальній гіпертензії та цукровому діабеті, знижує генерацію супероксидного аніона ( $\text{O}_2^-$ ) та відновлює активність cNOS у тканинах серця [4, 5].

Метою нашої роботи було дослідити вплив EMAP II на показники оксидативного стресу, конститутивного синтезу NO і ендотелійзалежне розслаблення судин у старих тварин.

© К.О. Драчук, Ю.П. Коркач, Н.О. Дорофєєва, О.І. Корнелюк, В.Ф. Сагач

## МЕТОДИКА

Ендотелійзалежне розслаблення ГМ проводили на ізольованих препаратах грудної аорти шурів-самців лінії Вістар віком 8 міс (дорослі,  $n = 10$ ) та 22–24 міс (старі,  $n = 8$ ), масою 300–370 г з дотриманням усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). У шурів виділяли грудну аорту, нарізали на кільцеві препарати і за загальноприйнятою методикою в режимі, наближеному до ізотонічного, реєстрували скоротливу активність ГМ [6]. Для активації ГМ аорти до перфузуючого розчину додавали норадреналін ( $10^{-5}$  моль/л, “Sigma”, США). Стійкий рівень залежного від цієї речовини скорочення («плато») приймали за 100%. Від нього проводили розрахунки зміни амплітуди ендотелійзалежних скоротливих реакцій ГМ аорти на дію ацетилхоліну ( $10^{-5}$  моль/л, “Sigma”, США). Застосовували ЕМАР II, отриманий у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України методом бактеріальної експресії [7]. Вводили його внутрішньовенно одноразово в дозі 28 мкг/кг.

У тканинах серця визначали біохімічні показники, які характеризують синтез оксиду азоту і є маркерами оксидативного стресу: швидкість генерації супероксидного радикала ( $\cdot O_2^-$ ), гідроксильного аніона ( $\cdot OH$ ), пули пероксиду водню ( $H_2O_2$ ). Рівень конститутивного синтезу NO оцінювали за активністю cNOS і вмістом нітрит-аніона ( $NO_2^-$ ), стан спряження/неспряження cNOS – за зміною індексу спряження cNOS, який розраховували через відношення активності cNOS до швидкості генерації  $\cdot O_2^-$ . Перераховані показники вимірювали спектрофотометричним методом [8]. Отримані результати представлені у відсотках відносно значення у дорослих тварин, які приймали за 100%. Результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 8,5 (Microcall Inc., США). Значення  $P < 0,05$  вважали статистично достовірним.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що додавання ацетилхоліну до буферного розчину завжди викликало типове розслаблення преактивованих норадреналіном ГМ аорти дорослих шурів. Середнє значення амплітуди становило  $64,9 \pm 3,5\%$  ( $n = 10$ ; рис. 1, 2). У старих шурів амплітуда ацетилхолініндукованого розслаблення ГМ аорти була суттєво меншою, ніж у дорослих тварин ( $7,5 \pm 1,4\%$ ;  $n = 10$ ; див. рис. 1, 2). Водночас відомо, що реакції ГМ на агоністи, незалежні від ендотелію, наприклад нітропрусид натрію, у цієї групи тварин не втрачаються і відтворюються майже без змін. Отже, порушується саме ендотелійзалежний компонент їх релаксації [9]. Введення старим щурам ЕМАР II повністю відновлювало ендотелійзалежне розслаблення. Середнє значення його амплітуди збільшувалося у 9 разів і становило  $66,6 \pm 6,8\%$  щодо  $7,5 \pm 1,4\%$  у старих шурів які не отримували препарат ( $n = 8$ ; див. рис. 1, 2).

Для встановлення можливих механізмів впливу ЕМАР II на розслаблення судин ми провели серію біохімічних дослідів. Як видно з рис. 3, у тканинах серця старих шурів розвивався оксидативний стрес. Так, швидкість генерації  $\cdot O_2^-$  і  $\cdot OH$ -радикала,

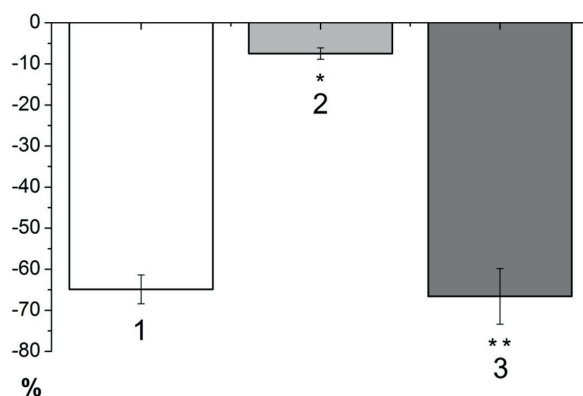


Рис. 1. Вплив ендотеліального моноактивуючого фактора (ЕМАР II) на ацетилхолініндуковане розслаблення преактивованих норадреналіном гладеньких м'язів аорти у шурів: 1 – дорослі (контроль), 2 – старі, 3 – старі після введення ЕМАР II. \* $P < 0,05$  відносно контролю, \*\* $P < 0,05$  відносно значення у старих шурів

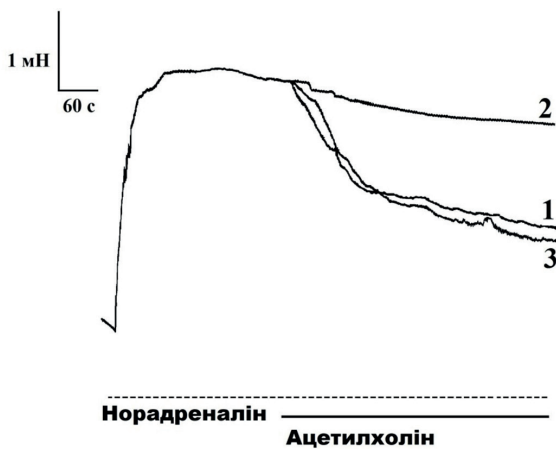


Рис. 2. Вплив ендотеліального моноцітактивуючого фактора (ЕМАР II) на ацетилхолініндуковане розслаблення преактивованих норадреналіном гладеньких м'язів аорти щурів (нативна крива): 1 – дорослі (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі після введення ЕМАР II. Темна лінія під кривими – тривалість дії ацетилхоліну, переривчаста – норадреналіну, який використовується для активації ГМ судин

ініціатора перекисного окиснення ліпідів, перевищувала контрольні значення в 3,7 і 4,1 рази відповідно. Оксидативний стрес, зокрема посилене утворення вільних радикалів призводить до окиснення 1) тетрагідробіоптерину – кофактора cNOS [10] і 2) глутатіону із наступним глутатіонуванням молекули cNOS [11, 12]. Ці два процеси є

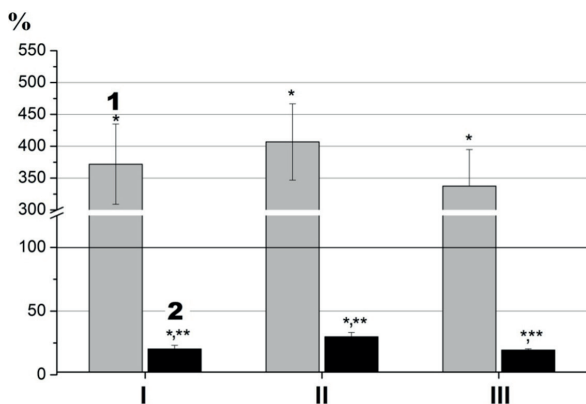


Рис. 3. Зміни показників оксидативного стресу в тканинах серця щурів перед (1) та після (2) дії ендотеліального моноцітактивуючого фактора (ЕМАР II): I – швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ , II – вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ , III – швидкість генерації  $\cdot\text{OH}$ -радикала. \*P < 0,05 відносно дорослих (контроль, 100%); \*\*P < 0,05 відносно значення у старих щурів

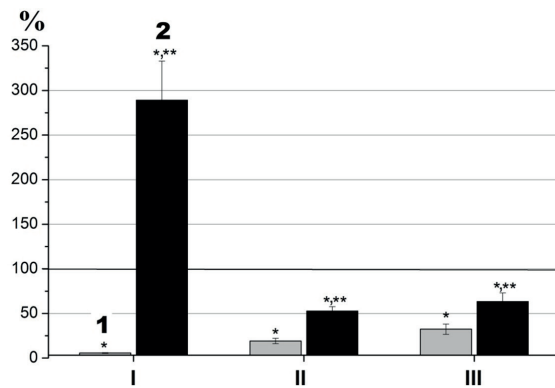


Рис. 4. Відносні значення показників конститутивного синтезу NO в тканинах серця щурів перед (1) та після (2) дії ендотеліального моноцітактивуючого фактора (ЕМАР II): I – індекс спряження cNOS, II – активність cNOS, III – вміст  $\text{NO}_2^-$ . \*P < 0,05 відносно дорослих (контроль, 100%); \*\*P < 0,05 відносно значення у старих щурів

основними причинами неспряженого (uncoupling) стану cNOS. Про це свідчило зниження у тканинах серця старих щурів у 17,6 рази розрахованого нами індексу спряження cNOS. Неспряжена cNOS індукує утворення супероксиду замість NO [13], що, з одного боку, призводить до зниження конститутивного синтезу NO, а з іншого – до появи хибного (самопідсилюючого) кола утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  і прогресування оксидативного стресу. На порушення конститутивного синтезу NO вказувало зниження активності cNOS (у 5,2 рази) і зменшення пулів  $\text{NO}_2^-$  (у 3,1 рази), окисного метаболіту NO (рис. 4).

Таким чином засоби, що пригнічують оксидативний стрес потенційно мають відновлювати і спряжений стан cNOS. А наслідком останнього будуть: 1) розрив самопідсилюючого кола утворення вільних радикалів кисню і азоту, 2) відновлення конститутивного синтезу NO. Такою речовиною за нашими результатами є ЕМАР II. Введення останнього суттєво знижувало швидкості утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  (у 18,3 рази) і  $\cdot\text{OH}$ -радикала (у 13,6 рази) і зменшувало пули  $\text{H}_2\text{O}_2$  (у 17,4 рази; див. рис. 3). Пригнічення оксидативного стресу супроводжувалося відновленням спряженого стану cNOS і посилення конститутивного синтезу вазо-

релаксуючого агента – NO. Так, індекс спряження cNOS збільшувався у 51 раз, активність cNOS – у 2,8, а пули  $\text{NO}_2^-$  – у 2 рази (рис. 4).

Отже, введення старим щурам ЕМАР II у використаній дозі призводило до пригнічення оксидативного стресу, відновлення спряженого стану cNOS і покращення конститутивного синтезу NO. Наслідком цього було повне відновлення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти у старих тварин.

## ВИСНОВКИ

1. У тканинах серця старих щурів розвивалися оксидативний стрес, неспряження стану cNOS і зниження конститутивного синтезу NO. Результатом цих біохімічних процесів стало порушення ендотелійзалежного розслаблення аорти.

2. ЕМАР II пригнічував оксидативний стрес, відновлював спряжений стан cNOS та збільшував конститутивний синтез NO. Наслідком цього було відновлення ендотелійзалежного розслаблення ГМ аорти старих щурів.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**К.О. Драчук, Ю.П. Коркач, Н.А. Дорофеева, А.И. Корнелюк, В.Ф. Сагач**

## ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ МОНОЦИТАКТИВИРУЮЩИЙ ФАКТОР II ВОССТАНАВЛИВАЕТ ЭНДОТЕЛИЙ ЗАВИСИМОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ АОРТЫ ПРИ СТАРЕНИИ

Исследовали влияние эндотелиального моноцитактивирующего фактора II (EMAP II) на эндотелийзависимое расслабление гладких мышц аорты у старых крыс. Установлено значительное его нарушение. Среднее значение амплитуды составило  $7,5 \pm 1,4\%$  по сравнению с  $64,9 \pm 3,5\%$

у взрослых здоровых крыс. Введение старым животным ЕМАР II полностью восстанавливало сосудистое расслабление. Так, его амплитуда увеличивалась с  $7,5 \pm 1,4$  до  $66,6 \pm 6,8\%$ . Этот эффект был обусловлен угнетением оксидативного стресса, восстановлением сопряжения cNOS (индекс сопряжения увеличивался в 51 раз) и увеличением конститутивного синтеза NO (активность cNOS возрастала в 2,8 раза).

Ключевые слова: эндотелиальный моноцитактивирующий фактора II; старение; эндотелийзависимое расслабление; оксидативный стресс; оксид азота.

**К.О. Drachuk, Yu.P. Korkach, N.A. Dorofeyeva, A.I. Kornelyuk, V.F. Sagach**

## EFFECT OF ENDOTHELIAL MONOCYTE-ACTIVATING POLYPEPTIDE-II ON ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASCULAR RELAXATION DURING AGING

We studied the effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II (EMAP II) on endothelium-dependent vascular relaxation in old rats. It was found a violation of endothelium-dependent aorta relaxation in these animals, the average value of its amplitude was  $7.5 \pm 1.4\%$  compared with  $64.9 \pm 3.5\%$  in healthy adult rats. EMAP II significantly improved endothelium-dependent relaxation in old animals, the average value of its amplitude increased to  $66.6 \pm 6.8\%$ . This effect was due to oxidative stress inhibition, cNOS recoupling and increasing of constitutive NO-synthesis; thus, index of cNOS coupling/uncoupling increased by 51 times and cNOS activity increased by 2.8 times.

Key words: endothelial monocyte-activating polypeptide-II; aging; endothelium-dependent relaxation; oxidative stress; nitric oxide.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; 1 Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: 8701dk@ukr.net*

## REFERENCES

- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):525-63.
- Van Hove CE, Van der Donck C, Herman AG, Bult H, Franssen P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):920-30.
- El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol.* 2012;28:3:132.

4. Dorofeyeva NA, Kotsuruba AV, Mogilnitskaya LA, Malyna AE, Kornelyuk AI, Sagach VF. Endothelial monocyteactivating factor II cancels oxidative stress, constitutive NOS uncoupling and induced violations of cardiac hemodynamica in hypertension (part II). Fiziol Zh. 2014;61(3):11-8. [Ukrainian].
5. Dorofeyeva NA, Vorobyov GG, Cherepaha IY, Kornelyuk AI, Sagach VF. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II improves diastolic heart function and vascular relaxation in streptozotocin-induced experimental diabetes. Fiziol Zh. 2017;63(6):3-8.
6. Drachuk KO, Kotsjuruba AV, BazilyukOV, Stepanenko LG, Sagach VF. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle in old rats. Fiziol Zh. 2014;60(4):3-10 [Ukrainian].
7. Dubrovsky AL, Brown D, Kornelyuk AI, Murray DK, Matsuka GC. Bacterial expression of full-length and truncated forms of thecytokine EMAP-2 and the cytokine-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolym and Cell. 2000;16 (3):229-35.
8. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. Fiziol Zh. 2014;60(3):11-7. [Ukrainian].
9. Tkachenko MN, Sagach VF, Kotsjuruba AV, Baziljuk OV, Buchanevich AM, Meged EF, et al. Endothelium-dependent contractile reactions of vascular smooth muscles and content of free radicals of oxygen of rats in aging. Fiziol Zh. 2002;48(4):3-13. [Ukrainian].
10. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martísek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. Free Radic Res. 2003;37(2):121-7.
11. Galougahi KK, Liu CC, Gentile C, Kok C, Nunez A, Garcia A, et al. Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction. J Am Heart Assoc. 2014;3(2):e000731.
12. Hill BG, Bhatnagar A. Protein S-glutathiolation: redoxsensitive regulation of protein function. J Mol Cell Cardiol. 2012;52(3):559-67
13. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. Cardiovasc Res. 2005;66(2):286-94.

*Матеріал надійшов  
до редакції 19.09.2019*