

О.Ю. Гарматіна, А.Г. Портниченко,
О.О. Мойбенко, А.В. Коцюруба, О.М. Буханевич

Експресія іNOS і активність іNOS і сNOS у правому і лівому шлуночках ізольованого серця щура при ішемії – реперфузії

Исследовали экспрессию индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и активность индуцибельной и конститутивных (сNOS) форм фермента в тканях изолированного сердца крыс-самцов Вистар после 30-мин тотальной ишемии и 40-мин постишемической реперфузии. Показано, что экспрессия и активность iNOS были более высокими в правом желудочке сердца, а активность сNOS – в левом. Последняя снижалась после ишемического повреждения. Напротив, экспрессия и активность iNOS, а также суммарная активность NOS прогрессивно возрастали после ишемии и реперфузии, все показатели были более высокими в правом желудочке сердца. После реперфузии экспрессия iNOS в правом желудочке несколько уменьшалась, хотя активность фермента продолжала увеличиваться. Полученные результаты могут свидетельствовать о различной регуляции продукции оксида азота в правом и левом желудочках сердца как в норме, так и при инфаркте миокарда.

ВСТУП

Загальновідома роль системи оксиду азоту (NO) в регуляторних, компенсаторних і патологічних реакціях організму. Вельми істотні зміни показників цієї системи описано при патології серця [3, 11, 12, 17, 18]. Разом з тим слід зазначити, що ці дані стосуються, в основному, змін вмісту NO, активності й експресії ферментів іNOS, сNOS в цілому серці або його лівому шлуночку, тоді як порівняльні дані про експресію та активність ферментів системи NO в ідентичних умовах в лівому і правому шлуночках серця, за винятком окремих робіт [14], відсутні.

Метою нашого дослідження було порівняння експресії іNOS і активності ферментів системи NO (іNOS, сNOS) у лівому та правому шлуночках серця у щурів в динаміці розвитку ішемії і реперфузії в дослідках на ізольованому серці, що перфузується.

МЕТОДИКА

Дослідження виконано на 12 щурах-самцях лінії Вістар масою 300–400 г.

Перфузія ізольованого серця. Для анестезії тваринам внутрішньоочеревинно вводили уретан (125 мг/кг), а потім гепарин (250 од/кг) за 10 хв до видалення серця. Після торакотомії серця вміщували в модифікований розчин Кребса з температурою 8–10°C. Серце підвішували, канюлюючи аорту для перфузії, і відмивали модифікованим розчином Кребса (37°C, рН 7,4) протягом 5 хв у камері, в якій за допомогою термостата підтримували сталу температуру 37°C. Розчин насичували карбогеном (95% O₂ і 5% CO₂) з постійною барботацією тією ж газовою сумішшю і подавали в аорту перистальтичним насосом. Серце перфузували ретроградним потоком через аорту згідно з методикою Лангендорфа [10] модифікованим розчином Кребса такого складу

(ммоль/л): NaCl – 118,2, KCl – 4,8, CaCl₂ – 1,7, MgSO₄ – 1,2, KH₂PO₄ – 1,2, NaHCO₃ – 25, глюкоза – 12 (рН 7,4). Швидкість перфузійного потоку встановлювали так, щоб перфузійний тиск в аорті сягав у середньому 60–65 мм рт. ст. Серце працювало протягом 15–20 хв до стабілізації рівнів всіх показників, що вимірюються.

Після моделювання ішемії – реперфузії проводили забір матеріалу (лівий шлуночок разом з міжшлуночковою перегородкою і правий шлуночок) по закінченні кожного етапу експерименту: етапу стабілізації показників ізольованого серця – через 20 хв після початку перфузії, після етапу стабілізації та ішемії – через 20+30 хв від початку перфузії, після стабілізації, ішемії і реперфузії – через 20+30+40 хв від початку перфузії. Матеріал негайно вміщували в рідкий азот для використання в біохімічних дослідженнях і Вестерн-блотінгу.

Визначення активності NO-синтаз. Для визначення активності NO-синтаз (Ca²⁺-залежної та Ca²⁺-незалежної) використовували комбінацію класичного методу [15] та сучасну його модифікацію [7], пристосовану для спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – нітрит-аніона [16]. З цією метою у 10 разів збільшили об'єм субстратної суміші і визначення активності фермента проводили з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності NO-синтаз, що визначалися, до існуючого (базального) рівня активності в досліджуваних тканинах.

Аліквоти грубих гомогенатів лівого та правого шлуночків серця (фракціонування гомогенатів не проводили з метою визначення інтегральної величини сумарної активності NO-синтаз), що містили 500–1000 мкг білка інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші наступного складу (ммоль/мл): KH₂PO₄ – 50, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, НАДФН – 1, L-аргінін – 2, рН 7,0 протягом 60 хв при 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2 моль/л HClO₄. Контролем

були проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо денатурований 2 моль/л HClO₄ білок. Суміш центрифугували при 3500 хв⁻¹ протягом 10 хв.

Для збільшення чутливості та специфічності запропонованої модифікації методу визначення активності NO-синтаз (оскільки визначення за збільшенням вмісту цитруліну не є коректним у зв'язку з можливістю його утворення за дії аргініндеїмідази [5]), у супернатантах досліджуваних проб (після припинення реакції і депротейнізації проб) визначали вміст NO₂⁻ високоспецифічним спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з реактивом Гріса. Чутливість методу – 1 мкг NO₂⁻ у 1мл, що робить його за чутливістю співрозмірним з радіоізотопним та RIA-дослідженнями, завдяки чому він тепер широко використовується для дослідження активності NO-синтаз.

Western blot analysis. Дослідження експресії білкових структур iNOS проводили за допомогою апаратного комплексу та протоколу Bio-Rad Laboratories (США) з використанням реагентів фірми «Sigma» (США). Тканину лівого (з міжшлуночковою перегородкою) і правого шлуночків серця механічно подрібнювали в рідкому азоті та гомогенізували в ультрагомогенізаторі, додаючи лізис-буфер (трис-HCl – 5 ммоль/л, рН 7,5, гліцерол – 10%, ЕДТА і ЕГТА по 0,5 ммоль/л, дитіотреїтол – 2 ммоль/л, коктейль інгібіторів протеаз («Sigma», США) – 1%, Тритон X-100 – 0,1%) з розрахунку – 2 об'ємні величини на 1 масову частку тканини і інкубували 30 хв на льоду. Потім центрифугували 20 хв при 10 000g і 4°C. Вміст білка в пробі визначали за методом BCA-1 («Sigma», США). Супернатанти (по 50 мкг білка) розділяли на 7,5% SDS-PAGE і переносили на PVDF-мембрани («Bio-Rad»). Мембрани блокували 4%-м розчином желатину 18 – 20 год, обробляли поліклональними анти-iNOS-антитілами («Sigma», США) 2 год, після відмивання обробляли антикро-

лячим IgG кози і забарвлювали за допомогою ExtrAvidinPeroxidase Staining Kit («Sigma», США) [8].

Одержаний матеріал опрацьовували за допомогою комп'ютерної денситометрії. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою тесту t Стьюдента, використовуючи програмне забезпечення Origin 6.0 фірми «Microcal Software, Inc.» (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показано на рис. 1, у наших досліджах спостерігалися істотні зміни експресії iNOS на всіх етапах експерименту: після перфузії на стадії стабілізації, після ішемії і після реперфузії. В усіх випадках експресія iNOS була значно вищою в правому шлуночку серця, ніж у лівому.

Були також певні відмінності експресії iNOS у динаміці експерименту. У лівому шлуночку експресія iNOS значно підвищувалася в період ішемії з подальшим, більш слабким посиленням у періоді реперфузії (див. рис. 1, 2). У правому шлуночку інтенсифікація в період ішемії змінювалася деяким послабленням експресії iNOS у період реперфузії (див. рис. 1, 2).

Ішемія і, особливо, реперфузія призводили до значного, статистично достовірного збільшення активності iNOS у обох шлуночках, але більшою мірою, знову ж таки, в правому (див. рис. 3). Так, у наших експериментах активність iNOS до кінця періоду реперфузії в лівому і правому шлуночках збільшилася до $199,13 \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1}\text{мг}^{-1} \pm 37,57 \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1}\text{мг}^{-1}$ білка і до $455,23 \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1}\text{мг}^{-1} \pm 32,63 \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1}\text{мг}^{-1}$ білка відповідно при реперфузії ($P < 0,05$). У правому шлуночку активність iNOS була в 2-2.5 раза більшою на всіх етапах експерименту, ніж у лівому, що узгоджується з отриманими нами результатами зміни експресії ферменту.

Активність конститутивних ферментів (сNOS) системи оксиду азоту зменшувалася в період ішемії і відновлювалася (не до початкового рівня) в період реперфузії в лівому шлуночку, але значно збільшувалася в ці ж періоди - в правому шлуночку (див. рис.3).

Таким чином, нами уперше показано, що за умов ізольованого перфузованого серця щура експресія ферменту iNOS у правому шлуночку значно вища, ніж у лівому. Ця закономірність спостерігалася на всіх етапах дослідів з тотальною ішемією і реперфузією серця (до ішемії, в період ішемії, в період реперфузії). Аналогічний характер носять зміни і активності iNOS у динаміці експериментів з ішемією і реперфузією серця. Активність iNOS підвищувалася відносно більше як при ішемії, так і при реперфузії саме в правому шлуночку серця.

Відомо, що для правого та лівого шлуночків характерні різний ступінь функціонального навантаження і структурні морфологічні відмінності, також описана певна різниця в метаболізмі обох шлуночків серця [1, 9, 14, 19] і їхня різна участь у регуляторних реакціях кровообігу [2, 4, 6, 13]. Зокрема показано, що концентрації міозину й актину, АТФазна активність актоміозину і споживання кисню вищі в лівому шлуночку, тоді як концентрація креатинфосфату, глі-

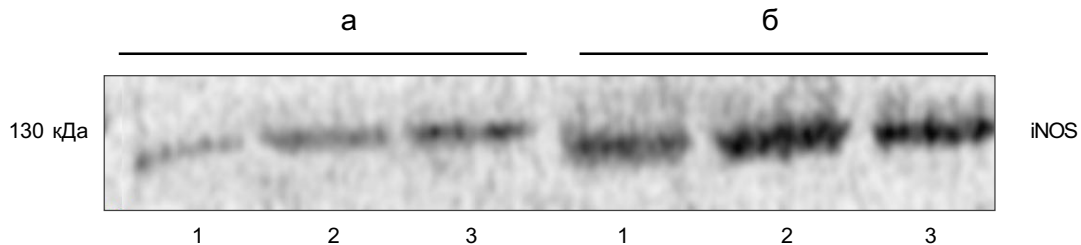


Рис.1. Експресія iNOS у лівому (а) та правому (б) шлуночках ізольованого серця щурів після 20-хвилинної перфузії (1), 30-хвилинної ішемії (2) та 40-хвилинної реперфузії (3).

когену та катехоламінів вища в правому шлуночку. Останнє пов'язується з необхідністю більш швидкої мобілізації функцій правого шлуночка серця при зміні венозного повернення крові [1]. В останні роки певні відмінності виявлено у вмісті поліненасичених жирних кислот [8] і фібронектину [19], зокрема при гіпоксії. В обох випадках найбільш істотні зміни спостерігалися в правому шлуночку.

Нам зустрілася лише одна робота стосовно порівняльної оцінки експресії iNOS в лівому і правому шлуночках щурів; за умов хронічної нормобаричної гіпоксії та гіпертрофії правого шлуночка показано значне збільшення експресії iNOS у правому гіпертрофованому шлуночку, порівняно з лівим (негіпертрофованим) шлуночком [14]. Залишається невідомим, чим зумовлена ця різниця розвитком гіпертрофії чи особливостями метаболізму в системі NO в правому шлуночку. Отримані нами результати схиляють нас до думки про можливість останнього пояснення цих відмінностей. Певні відмінності були і при зміні активностей індукцибельної і конститутивних форм нітрооксидсинтаз у динаміці ішемії і реперфузії в лівому шлуночку серця: збільшення активності індукцибельної NOS і зменшення

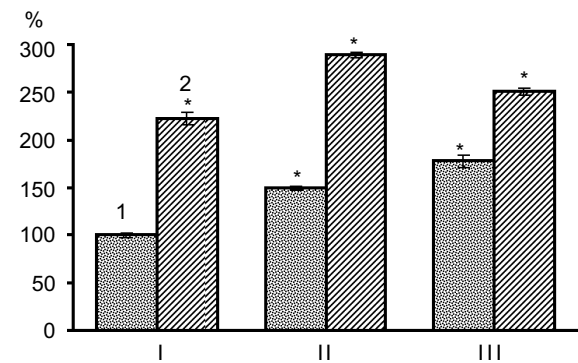


Рис.2. Відносні показники експресії iNOS у міокарді ізолюваного серця щура (у відсотках відносно денситометричних показників в лівому шлуночку до ішемії): 1 – лівий шлуночок, 2 – правий шлуночок; I – перфузія, II – ішемія, III – реперфузія.

* $P < 0,005$ відносно перфузії (лівий шлуночок).

конститутивних NOS у період ішемії і реперфузії. Останнє збігається з даними, що були опубліковані раніше [3], про зміни в динаміці активності NOS у лівому шлуночку при його локальній ішемії в експериментах на собаках.

Таким чином, за допомогою метода імуноблотінгу показано, що за ідентичних умов (ізолюване перфузоване серце щурів) експресія ферменту iNOS у правому шлуночку серця значно вища, ніж у лівому. При тотальній ішемії та реперфузії спостерігається збільшення експресії й активності iNOS в обох шлуночках, але знову ж, переважно в правому. Зміни активності для iNOS і cNOS мають істотні відмінності.

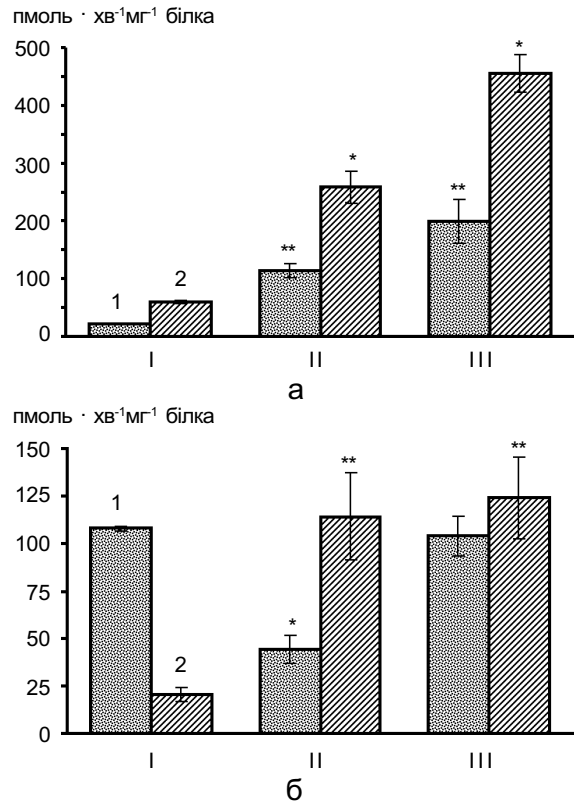


Рис. 3. Активність індукцибельної (а) і конститутивних (б) NO-синтаз при ішемії та реперфузії ізолюваного серця щура: 1 – лівий шлуночок, 2 – правий шлуночок; I – перфузія, II – ішемія, III – реперфузія.

* $P < 0,05$ відносно перфузії (лівий шлуночок);

** $P < 0,05$ відносно перфузії (правий шлуночок).

Характер змін експресії і активність ферментів певною мірою залежать від їх вихідного рівня.

O.Yu. Harmatina, A.G. Portnychenko, O.O. Moybenko, A.V. Kotsiuruba*, O.M. Bukhanevich*

EXPRESSION OF INOS AND ACTIVITIES OF NOS ISOFORMS IN RIGHT AND LEFT VENTRICLES OF ISOLATED RAT HEART DURING ISCHEMIA AND REPERFUSION

Isolated using Langendorff technique hearts of male Wistar rats were ischemized for 30 min and reperfused for 40 min. Both iNOS expression determined by immunoblotting, and its activity shown by a modified Griess method have been found to predominate in the right ventricle over the left one, as compared to cNOS activity which prevailed in the left ventricle. The latter significantly diminished after an ischemic injury in the left ventricle. On the contrary, an expression of iNOS and the total NOS activities increased progressively after ischemia and postischemic reperfusion; all the values in the right ventricle were higher than in the left one. The high level of iNOS expression in the right ventricle in a postischemic period decreased during reperfusion, although an activity of the enzyme went on elevating. These data can give an evidence for different regulation of NO synthesis in right or left ventricles of the heart, including normal conditions or ischemia.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology of Ukraine, Kiev;

**Institute of Biochemistry of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Меерсон Ф.З., Капелько В.И., Радзиевський С.А. Соотношение сократительной функции и метаболизма левого и правого желудочков сердца // Кардиология. – 1968. – 8, №2. – с. 146–157.
2. Мойбенко А.А. Кардиогенные рефлексy и их роль в регуляции кровообращения. – К. Наук. думка, – 1979. – 264 с.
3. Мойбенко О.О., Юзьків М.Я., Коцюруба А.В. та ін. Про зміни системи оксиду азоту при гострій ішемії-реперфузії міокарда // Фізіол. журн. – 2000. – 46, №6. – С. 3–11.
4. Ткаченко Б.И., Поленов С.А., Агнаев А.К. Кардиоваскулярные рефлексy. Л.: Медицина, 1975. – 232 с.
5. Albina J.E., Mills C.D., Barbul A. et al. Arginine metabolism in wounds // Amer. J. Physiol. – 1988. – 254, №4. – P.459–467.
6. Aviado D.M., Schmidt C.F. Reflexes from stretch receptors of blood vessels, heart and lungs // Physiol. Rev. – 1955. – 35. – P.247–300.
7. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. et al. Increased activity and expression of Ca(2+)-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, №5. – P.797–804.
8. Guo Y., Jones W.K. et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 1999. – 28, № 96(20). – P. 11507–11512.
9. Jezkova J., Novakova G., Kolar F. et al. Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium // Mol. Cell. Biochem. – 2002. – 232, №1–2. – P. 49–56.
10. Meng X., Ao L., Brown J.M. et al. Nitric oxide synthase is not involved in cardiac contractile dysfunction in a rat model of endotoxemia without shock // Shock. – 1997. – 7. – P. 111–118.
11. Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // Pharmacol. Rev. – 1991. – 43. – P. 109–141.
12. Prendergast B.D., Sagach V.F., Shah A.M. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart // Circulation. – 1997. – 19, №4 (96). – P. 1320–1329.
13. Ross J., Frahm C.J., Braunwald E. The influence of intracardiac baroreceptors on venous return, systemic vascular volume and peripheral resistance // J.Clin. Investig. – 1961. – 40. – P.563–572.
14. Rouet-Benzineb P., Eddahibi S., Raffestin B. et al. Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1999. – 31, №9. – P. 1697–708.
15. Selzer M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases // FEBS Lett. – 1991. – 291, №1. – P.145–149.
16. Vodovotz Y., Kwon N.S., Pospischil M. et al. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide // J. Immunol. – 1994. – 152, №8. – P.4110–4118.
17. Wang D., Yang X.P., Liu Y.H. et al. Reduction of myocardial infarct size by inhibition of inducible nitric oxide synthase // Amer. J. Hypertens. – 1999. – 12. – P. 174–182.
18. Xiong J.H., Li Y.H., Nie J.L., Yu X.Y. Effects of nitric oxide on myocardial contraction function // Space Med. Med. Eng. (Beijing) – 2002. – 15, №2. – P. 149–151.
19. Xu Y., Shiraiishi K., Mori M., Motomiya M. Changes of fibronectin in the right and left ventricles of rats exposed to chronic normobaric hypoxia // Tohoku J. Exp. Med. – 1992. – 168, №4. – P. 573–582.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольца НАН України, Київ;
Ин-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ*

Матеріал надійшов до редакції 17.11.2002