

А.Г. Портниченко, М.І. Василенко, О.О. Мойбенко

Вплив гострої гіпоксичної гіпоксії на індукцію синтази оксиду азоту у щурів

Крыс – самцов линии Вистар подвергали острой нормобарической гипоксической гипоксии (10% O₂) на протяжении 1 или 3 ч. Через 24 ч обнаружено преобладание экспрессии протеина iNOS (методом Western blotting) в правом желудочке сердца по сравнению с левым (у intactных и опытных крыс), а также рост экспрессии iNOS в миокарде и легких в ответ на гипоксию. Таким образом, острая гипоксия приводит к индукции iNOS, степень которой зависит от продолжительности воздействия. Преобладание индукции iNOS в правом желудочке сердца и легких может указывать на важную роль NO-зависимых механизмов в малом круге кровообращения при гипоксии.

ВСТУП

Монооксид азоту (NO) є регулятором судинного тонуусу, міжклітинної кооперації клітин крові та судинного ендотелію, процесів клітинної активації, апоптозу, коагуляції крові, реакцій неспецифічної резистентності та інших функцій. Тому значний інтерес викликає дослідження участі NO у механізмах пошкодження та компенсації при гіпоксії. Показано підвищення експресії індубельної синтази оксиду азоту (iNOS) у клітинах різних органів при хронічній і переривчастій гіпоксії, що свідчить про роль NO у процесах адаптації до гіпоксії [1, 5, 8]. Однак результати впливу гострої гіпоксії на експресію iNOS є суперечливими [3, 4, 6].

Метою нашої роботи було дослідження залежності експресії iNOS у різних органах і тканинах дослідних тварин від тривалості впливу гострої гіпоксичної гіпоксії.

МЕТОДИКА

Щурів-самців лінії Вистар масою 350 – 380 г піддавали дії нормобаричної гіпоксії

протягом 1 год (I група, n=6) або 3 год (II група, n=6), вміщуючи тварин до скляної камери з постійним протоком гіпоксичної газової суміші (90% N₂, 10% O₂). Контрольних тварин утримували за аналогічних умов, але при диханні атмосферним повітрям. Через 24 год тварин декапітували, тканини серця (лівий шлуночок з міжшлуночковою перегородкою та правий шлуночок), легень і печінку негайно заморожували в рідкому азоті.

Експресію iNOS визначали методом Western blotting з використанням обладнання та протоколів фірми “Bio-Rad Laboratories” (США), реагентів і антитіл – фірми “Sigma”(США). Тканини гомогенізували в лізис-буфері (трис-НСІ – 5 ммоль/л, рН 7,5, гліцерол – 10%, ЕДТА та ЕГТА – по 0,5 ммоль/л, дитіотреїтол – 2 ммоль/л, фенілметилсульфонілфторид – 0,2 ммоль/л, “коктейль інгібіторів протеаз” – 1%, Тритон Х-100 – 0,1%), центрифугували 20 хв (10000 g, 4 °С). У супернатантах визначали вміст білка методом ВСА-1 (“Sigma”, США). Супернатанти (по 50 – 100 мкг білка) розділяли на 7,5% -му по-

ліакриламідному гелі (n=3 у кожній пробі) та переносили на PVDF-мембрани. Останні блокували 4%-м розчином желатину, обробляли поліклональними анти-iNOS-антитілами 2 год, анти-кролячим IgG кози та забарвлювали за допомогою набору реактивів ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit ("Sigma", США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

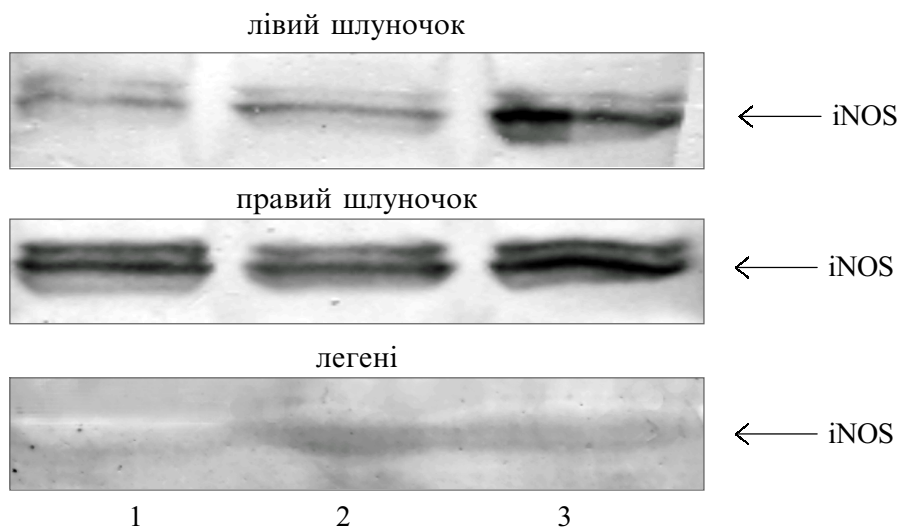
Аналіз результатів показав, що експресія протеїну iNOS у правому шлуночку серця була у всіх групах вищою, ніж у лівому шлуночку (рисунок). При короткостроковому впливі гіпоксії (1 год) рівень експресії iNOS дещо підвищувався порівняно з контрольними показниками тільки в лівому шлуночку серця. При більш тривалому впливі гіпоксії (3 год) експресія збільшувалася в обох шлуночках.

На відміну від цього, вихідний невисокий рівень експресії iNOS у тканині легень підвищувався вже при короткостроковій гіпоксії, а при більш тривалому впливі подальшого підвищення значень показників не спостерігали. У печінці контрольних тварин iNOS визначалася у дуже незначній кількості, а гіпоксія приз-

водила лише до деякого збільшення експресії ферменту. Одержані нами відмінності вихідних показників експресії протеїну iNOS у тканинах серця, легень і печінки відповідають даним літератури про різну експресію в цих тканинах мРНК iNOS [4].

Безперечно, пріоритетним результатом цього дослідження є спостереження відмінності експресії iNOS у лівому та правому шлуночках серця. Відомо, що регуляція кровотоку та метаболізму в правому шлуночку значно відрізняється від таких у лівому шлуночку, а інгібіція синтезу NO знижує коронарний кровотік переважно в правому шлуночку [7]. Однак причинно-наслідковий зв'язок між значною експресією iNOS у правому шлуночку та можливою участю NO у локальній регуляції коронарного кровотоку в нормі та при гіпоксії залишається поки не з'ясованим. Крім того, NO знижує споживання кисню правим шлуночком серця [7], що також може мати протективний ефект при гіпоксії.

Водночас дослідження гіпоксичної вазоконстрикції в ізольованих легенях мишей, дефіцитних за генами різних ізоформ NOS, показало, що ендотеліальна NOS та iNOS беруть участь у модуляції базаль-



Експресія iNOS у лівому (з перегородкою), правому шлуночках серця та легенях шурів через 24 год після впливу гострої гіпоксичної гіпоксії: 1 – контроль, 2, 3 – після впливу гіпоксії протягом 1 і 3 год відповідно.

ного тону легеневої артерії [2]. Це дозволяє припустити можливу участь iNOS правого серця і легень у регуляції легеневого кровотоку, в тому числі при гіпоксії.

Відомо, що ініціальна відповідь мікросудинного русла на гіпоксію супроводжується утворенням активних метаболітів кисню, при цьому спостерігається протективна дія NO. При гіпоксії вміст кисневих радикалів збільшується, але він нормалізується після повернення до нормоксії [5]. У наших дослідженнях відмінності індукції iNOS у тканинах при дії гіпоксії різної тривалості (з наступною нормоксією) можуть свідчити про існування порога гіпоксичного впливу, необхідного для індукції ферменту. Це може бути пов'язано зі ступенем зміщення балансу активних метаболітів кисню/NO.

Слід враховувати, що регуляція продукції NO клітинами у відповідь на гіпоксію може здійснюватися на рівнях транскрипції, експресії ферменту, модуляції його активності, наявності субстрату, а також через механізми системного рівня та організму в цілому [1, 3 – 6, 8], що може бути джерелом суперечливих результатів. Так, рівень транскрипції мРНК iNOS може не збігатися з рівнем експресії цього білка при гострій гіпоксії [3, 4], однак створювати можливість подальшої індукції білка-ферменту і синтезу NO залежно від інтенсивності впливу та часу розвитку відповіді на нього.

Таким чином, одержані результати можуть свідчити про залежність індукції білка iNOS від тривалості гострої гіпоксії, а також про різну швидкість і ступінь індукції ферменту у різних органах і тканинах, що вказує на послідовне включення органів і систем в NO-залежні компенсаторні механізми при гіпоксії. Підвищена експресія протеїну iNOS у правому шлуночку серця, а також її зростання в міокарді та легенях у відповідь на гіпок-

сію, можуть свідчити про важливість NO-залежних компенсаторних реакцій на гіпоксію в малому колі кровообігу.

A.G. Portnychenko, M.I. Vasilenko, A.A. Moybenko

INFLUENCE OF ACUTE HYPOXIC HYPOXIA ON NITRIC OXIDE SYNTHASE INDUCTION IN RATS

Male Wistar rats were exposed to acute normobaric hypoxia (10% O₂) during 1 or 3 h. After 24 h iNOS protein expression was estimated in tissues by Western blotting. It was found, that iNOS protein expression was higher in heart right ventricles versus left ventricles in both control (intact) and hypoxic animals. Hypoxia caused marked time-depending iNOS induction in both heart ventricles and lungs but not significant in livers. These results suggest that iNOS-produced NO can play a role in response to acute hypoxia, acting at least on pulmonary circulation.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Манухина Е.Б., Машина С.Ю., Смирин Б.В. и др. Оксид азота и адаптация к гипоксии // Физиол. журн. – 2001. – 47, №1(ч.2). – С.28 – 35.
2. Fagan K.A., Tyler R.C., Sato K. et al. Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, №3, Pt 1. – P. L472 – L478.
3. Fitzl G., Welt K., Martin R. et al. The influence of hypoxia on the myocardium of experimentally diabetic rats with and without protection by Ginkgo biloba extract. I. Ultrastructural and biochemical investigations on cardiomyocytes // Exp/ Toxicol/ Pathol. – 2000. – 52, №5. – P.419 – 430.
4. Gess B, Schricker K, Pfeifer M, Kurtz A. Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats // Amer. J. Physiol. – 1997. – 273, №3, Pt 2. – P. R905 – R910.
5. Gonzalez N.C., Wood J.G. Leukocyte-endothelial interactions in environmental hypoxia // Adv. Exp. Med. Biol. – 2001. – 502. – P. 39 – 60.
6. Kantrow S.P., Huang Y.C., Whorton A.R. et al. Hypoxia inhibits nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung // Amer. J. Physiol. – 1997. – 272, №6, Pt 1. – P. L1167 – L1173.
7. Setty S., Bian X., Tune J.D., Downey H.F. Endogenous nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in canine right ventricle // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2001. – 281, №2. – P. H831 – H837.
8. Ye J.S., Tipoe G.L., Fung P.C., Fung M.L. Augmentation of hypoxia – induced nitric oxide generation in the rat carotid body adapted to chronic hypoxia: an involvement of constitutive and inducible nitric oxide synthases // Pflug. Arch. – 2002. – 444, №1 – 2. – P.178 – 185.

Ін – т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ