

**О. К. Кульчицкий, Р. І. Потапенко, С. М. Новікова,  
М. К. Бурчинська**

*Державна установа "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова  
НАМН України", 04114 Київ*

## **ВПЛИВ ГОСТРОЇ ГІПОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ НА СТАН СИСТЕМИ МОНООКСИДУ АЗОТУ У МІОКАРДІ І СТІНЦІ АОРТИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ**

Аналіз результатів, одержаних в дослідженнях продукції монооксиду азоту (NO, за рівнем стабільних метаболітів), активності NO-синтази (NOS) і рівня експресії відповідних генів у міокарді та аортальній стінці 15 нелінійних дорослих (6–8 міс) та 15 старих (24–26 міс) щурів-самців за умов дії нетривалої гострої гіпоксії, дозволив встановити істотні вікові і тканинні відмінності. У міокарді інтактних дорослих і старих щурів рівень стабільних метаболітів істотно не відрізняється, втім у старих він реєструється за дещо більш низьких рівнях ферментативної активності та експресії гена eNOS і незмінної активності iNOS при підвищенні експресії її гена. В аортальній стінці рівень стабільних метаболітів NO при старінні істотно знижується (більшою мірою  $\text{NO}_2^-$ ) на фоні незначного падіння активності обох ізоформ NOS і стабільного рівня експресії їх генів. За умов дії гіпоксії продукція NO зростає як у міокарді, так і особливо у стінці аорти щурів обох вікових груп (більш виражено у дорослих) та відбувається різними шляхами. У міокарді дорослих щурів це здійснюється шляхом підвищення активності iNOS, а також за рахунок активації редуктазного компонента циклу NO, у старих — лише за зростання активності iNOS, що повністю співпадає з посиленням експресії її гена. В аортальній стінці дорослих щурів за цих умов значне збільшення (майже у 3 рази) продукції NO відбувається шляхом помірної і майже однакової активації обох ізоформ NOS і експресії відповідних генів, втім більшою мірою eNOS. У старих щурів збільшення концентрації стабільних метаболітів менш виражене і відбувається за рахунок як  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  і реєструється за відсутності зміни активності обох NOS та зростання рівня експресії гена iNOS.

**Ключові слова:** старіння, гіпоксія, міокард, аорта, оксид азоту, експресія генів NOS.

Стійкість організму до гіпоксії, особливо її геронтологічний аспект, залишається важливою проблемою медичної науки. По-перше, це зумовлено тим, що по суті всі патологічні, а також деякі фізіологічні процеси тою чи іншою мірою пов'язані з дефіцитом кисню. По-друге, зміни, що відбуваються з віком в організмі людини і тварин на різних рівнях життєдіяльності, зумовлюють зниження адаптаційних можливостей [9, 11] і, як наслідок — його стійкості до стресових чинників довкілля, чільне місце серед яких посідає гіпоксія. Крім того, викликані дефіцитом кисню метаболічні зрушення можуть сприяти розвитку або ускладненню захворювань (зокрема, серцево-судинної системи), поширеність яких з віком значно зростає. У той же час, вже з початку 90-х років показано, що крім адекватного кровопостачання різних органів, систем і організму в цілому в залежності від їх функціонального стану важливу роль в адаптивних і стресових ситуаціях відіграє система монооксиду азоту (NO). Більше того, встановлено, що молекула NO є одним з універсальних регуляторів фізіологічних функцій організму. Пізніше було прямо доведено, що NO є однією з головних ланок, від якої залежить формування адаптивних реакцій на пошкоджуючі впливи, і може бути підґрунтям адаптивної стійкості за дії гіпоксії [1, 5, 13].

Інтенсивно проводяться дослідження впливу гострої і хронічної гіпоксії на стан системи NO. Одержані різними авторами дані доволі різноманітні і неоднозначні, що залежить від тривалості і тяжкості гіпоксичного впливу, а також об'єкта дослідження. Втім, здебільшого вони дозволяють дійти висновку, що гостра і нетривала гіпоксія спричиняє збільшення продукції NO, а хронічна (виснажлива), навпаки — її падіння, що залежить від спрямованості змін активності NO-синтаз, рівня експресії їх генів і ферментних протеїнів та інших факторів. Проте слід зауважити, що зазначені результати одержані на ранніх етапах онтогенетичного розвитку тварин, здебільшого на статевозрілих та дорослих. Що стосується пізнього його етапу, є лише поодинокі та доволі суперечливі дослідження стану системи NO; до того ж вони проведені здебільшого на експериментальних тваринах, яких лише умовно можна віднести до старих [20, 21, 24, 25].

Метою роботи було з'ясувати можливі вікові відмінності стану окремих ланок системи NO у міокарді і аортальній стінці дорослих і старих щурів та їх реакції на дію гострої гіпоксії.

**Матеріал та методи.** Досліди проведені на 15 нелінійних 6–8-місячних (дорослих) і 15 24–26-місячних (старих) щурах-самцях, що утримувались у віварії за звичайних умов споживання їжі та води і освітлення, які були розподілені на чотири групи по 7–8 тварин у кожній — дві контрольні (інтактні) і дві дослідні (перебування в барокамері на "висоті" 6000 м над рівнем моря протягом трьох годин, "підйом/спуск" зі швидкістю 1000 м/хв).

Евтаназію щурів здійснювали через 24 год під "легким" ефірним наркозом, проводили забір крові, вилучали серце і аорту, яких промивали охолодженим фізіологічним розчином і негайно заморожували в рідкому азоті.

NOS-активність у гомогенатах міокарда і аорти визначали спектрофотометричним методом [6] та виражали у нмоль окисленого *NADPH*/г тканини. Рівень стабільних метаболітів (суму нітріт- і відновленого до  $\text{NO}_2^-$  нітрат-аніонів) визначали методом Гріна з використанням реактиву Гріса [14], та виражали у нмоль/мл плазми або нмоль/г тканини.

Рівень експресії генів індукцибельної (*iNOS*) і ендотеліальної (*eNOS*) NO-синтаз у міокарді та аорті визначали методом напівкількісного аналізу шляхом зворотної транскрипції мРНК, амплікації синтезованої цільової кДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням специфічних праймерів і наступним електрофорезом продуктів ПЛР у горизонтальному агарозному гелі [16]. Продукти ПЛР візуалізували в ультрафіолетовому світлі з транслюмінатора та фотографували. Кількість специфічних продуктів ПЛР визначали денситометричним методом та виражали як добуток площі плями на інтенсивність світіння за використанням програмного забезпечення "*TotalLab TL 120 ID v 2009*" ("*Nonlinear Dinamic Ltd*", Великобританія). Рівень експресії генів розраховували як відношення кількості відповідного продукту ПЛР (*iNOS* і *eNOS*) до кількості продукту ПЛР для контрольного гена *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) [19].

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за *t*-критерієм Стьюдента.

**Результати та їх обговорення.** Аналіз одержаних результатів (таблиця) свідчить про те, що рівень експресії гена *eNOS* в міокарді старих інтактних шурів нижчий, ніж у дорослих (на 28 %), а *iNOS* — значно вищий (на 75 %). У стінці аорти шурів обох вікових груп рівень експресії генів названих ферментів не відрізняється. За умов дії гіпоксії у міокарді дорослих тварин експресія гена *eNOS* зростає (на 45 %), а *iNOS* — не змінюється. У старих шурів, навпаки, експресія гена *eNOS* залишається на рівні контрольних, а *iNOS* — значно зростає (більше ніж у два рази). У стінці аорти дослідних дорослих шурів підвищується експресія генів обох ферментів (*eNOS* — на 50 %, *iNOS* — на 40 %), а у старих — лише *iNOS*, втім більш істотно — на 87 % (див. табл.).

Співставлення величин експресії генів та NO-синтазної активності досліджених тканин за умов фізіологічного спокою свідчить про те, що більш низькому порівняно з дорослими рівню експресії гена *eNOS* у міокарді старих шурів відповідає і менша активність ферменту. Що стосується *iNOS*, то, незважаючи на значно більш високий, ніж у дорослих, рівень експресії гена у старих шурів, активність ферменту у них істотно не відрізняється. У стінці аорти інтактних шурів обох вікових груп експресія гена і активність *eNOS* були однакові. Активність *iNOS* у старих нижча за таку у дорослих, втім рівень експресії її гена в них не відрізняється. Під впливом гострої гіпоксії у міокарді дорослих шурів активність *eNOS* не зазнає істотних змін, натомість експресія її гена збільшується. Активність *iNOS*, навпаки, зростає за стабільного рівня експресії гена.

У міокарді старих дослідних тварин експресія гена і активність *eNOS* залишаються на рівні контрольних, водночас зростають майже

вдвічі активність *i*NOS і експресія відповідного гена. У стінці аорти підданих гіпоксії дорослих щурів реєструється майже однакова за величиною активація (> на 30–35 %) обох NO-синтаз, яка збігається з посиленням експресії відповідних генів. В аорті старих дослідних щурів активність *e*NOS і *i*NOS залишається на вихідному рівні, експресія гена *e*NOS не зазнає змін, а *i*NOS — зростає на 63 %.

**Вплив гострої гіпоксичної гіпоксії на експресію генів *e*NOS та *i*NOS, активність NO-синтаз і рівень стабільних метаболітів в міокарді та аортальній стінці щурів різного віку,  $M \pm m$**

Показник	Дорослі		Старі	
	контроль ( <i>n</i> = 7)	дослід ( <i>n</i> = 8)	контроль ( <i>n</i> = 7)	дослід ( <i>n</i> = 8)
Міокард				
Експресія генів				
<i>e</i> NOS	0,58 ± 0,003	0,84 ± 0,001**	0,42 ± 0,002##	0,38 ± 0,003***
<i>i</i> NOS	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,07 ± 0,002##	0,16 ± 0,005***
Аорта				
<i>e</i> NOS	0,74 ± 0,003	1,11 ± 0,004*	0,71 ± 0,005##	0,68 ± 0,004***
<i>i</i> NOS	0,05 ± 0,002	0,07 ± 0,005*	0,06 ± 0,002#	0,098 ± 0,003***
Міокард				
Активність NOS, нмоль/(хв · мг тканини)				
<i>e</i> NOS	0,155 ± 0,013	0,180 ± 0,011	0,128 ± 0,07	0,140 ± 0,06
<i>i</i> NOS	0,129 ± 0,011	0,159 ± 0,08	0,110 ± 0,02	0,206 ± 0,01**
Аорта				
<i>e</i> NOS	0,066 ± 0,003	0,089 ± 0,001**	0,071 ± 0,005	0,068 ± 0,004#
<i>i</i> NOS	0,077 ± 0,004	0,100 ± 0,005*	0,061 ± 0,002#	0,062 ± 0,003##
Міокард				
Рівень стабільних метаболітів, нмоль/г тканини				
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	123,1 ± 10,2	232,5 ± 9,8**	118,7 ± 12,4	142,3 ± 10,2##
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	95,3 ± 1,7	92,6 ± 2,1	86,2 ± 2,3#	110,1 ± 1,9***
Аорта				
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	36,9 ± 1,7	92,6 ± 2,1**	23,2 ± 2,3##	57,1 ± 1,9***
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	64,5 ± 1,3	54,6 ± 1,1*	51,3 ± 1,2##	70,6 ± 1,1***

Примітки: \* —  $P < 0,01$ , \*\* —  $P < 0,001$  порівняно з контролем; # —  $P < 0,01$ , ## —  $P < 0,001$  порівняно з відповідною групою дорослих.

У той же час, співставлення NO-синтазної активності і рівня стабільних метаболітів свідчить про те, що однакові їх параметри у міокарді інтактних щурів обох вікових груп реєструються за дещо більш низьких у старих тварин активності *e*NOS і експресії її гена. Активність *i*NOS у них істотно не відрізняється, проте рівень експресії її гена у міокарді старих щурів значно перевищує такий у дорослих (на 75 %). У стінці аорти старих щурів рівень стабільних метаболітів, навпаки, значно менший, ніж у дорослих (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> — на 38 %, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> — на 16 %), за од-

накової активності *eNOS*, але більш низької *iNOS* та однакового рівня експресії відповідних генів.

За умов дії гіпоксії міокард дорослих щурів реагує різким (майже дворазовим) зростанням концентрації  $\text{NO}_2^-$  при стабільному рівні активності *eNOS* та незначної активації *iNOS*. Натомість, у міокарді старих щурів рівень  $\text{NO}_2^-$  збільшується лише на 20 %,  $\text{NO}_3^-$  — на 28 % за відсутності активації *eNOS*, втім на фоні майже дворазового зростання активності *iNOS*. Стрімка активація *iNOS* у міокарді старих тварин буде супроводжуватись зростанням продукції дуже активного супероксидного радикалу і токсичного пероксинітриту. Перше призводить до зниження рівня  $\text{NO}$ , який буде використовуватись для нейтралізації  $\text{O}_2$ , а подальші перетворення пероксинітриту — до підвищення рівня  $\text{NO}_3^-$ . На користь цієї думки свідчать одержані раніше результати щодо більш значної у міокарді старих щурів порівняно з дорослими активації ліпідної пероксидації, а також зростання окисної модифікації протеїнів [4].

У стінці аорти гіпоксія теж призводить до підвищення рівня стабільних метаболітів  $\text{NO}$ , особливо нітритів (250 % у дорослих, 148 % у старих), а також помірного зростання рівня нітратів в аортальній стінці (39 %) і майже дворазового в плазмі крові лише у старих тварин. Це реєструється за помірної активації обох форм ферменту у дорослих щурів і співпадає зі зростанням експресії відповідних генів. У старих щурів за цих умов активність обох *NOS* залишається на рівні контрольних, втім істотно збільшується експресія гена *iNOS*.

Таким чином, результати проведених нами досліджень дозволили виявити вікові і тканинні особливості рівнів експресії генів конститутивної (ендотеліальної) та індукцйбельної  $\text{NO}$ -синтаз, їх ферментативної активності і рівня стабільних метаболітів  $\text{NO}$  у міокарді і судинній стінці дорослих і старих щурів як за умов фізіологічного спокою, так і дії гострої гіпоксії. Якщо брати до уваги рівень експресії генів і активність відповідних  $\text{NO}$ -синтаз, можна зробити висновок, що у процесах забезпечення монооксидом азоту у старих тварин більшою мірою у міокарді, меншою — в аортальній стінці зменшується роль конститутивної (ендотеліальної) *NOS* і зростає роль індукцйбельної форми ферменту. Особливої уваги заслуговує більш низький у міокарді старих щурів порівняно з дорослими рівень експресії гена і ферментативної активності *eNOS* вже за умов фізіологічного спокою, який не зазнає змін і після дії гіпоксії. Не виключено, що це зумовлено віковими змінами гена *eNOS*, зокрема промотерної зони, яка відповідає за важливий етап експресії — транскрипцію мРНК. В аортальній стінці інтактних дорослих і старих щурів рівень експресії гена *eNOS* не відрізняється.

Що стосується відсутності повної відповідності за часом змін експресії генів і активності  $\text{NO}$ -синтаз за дії гіпоксії та їх вікових особливостей, то вони можуть бути зумовлені функціональною специфікою тканин і неоднаковим порогом гіпоксичної чутливості, необхідної для індукції синтезу ферментів, а також віковими і тканинними особливостями тимчасової експресії транскрипційного фактора *HIF-1 $\alpha$*  [10,

22]. Натомість слід зауважити, що відсутність повного збігу за часом змін експресії генів і індукції синтезу ферментів не виключає того, що зростання експресії генів буде сприяти збільшенню індукції і синтезу протеїну ферментів у подальшому [12].

У свою чергу, розбіжності між рівнем активності NOS і рівнем стабільних метаболітів (збільшення концентрації за відсутності зростання ферментативної активності), що спостерігаються за дії гіпоксії в міокарді (особливо в аортальній стінці дорослих шурів і лише в тканинах аорти старих тварин за умов дії гіпоксії), зумовлені, скоріш за все, активацією відтворення NO шляхом відновлення стабільних метаболітів ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) [3, 8, 15]. Останній, як відомо, активується за дефіциту кисню і вважається тимчасовим, до того ж енергонезалежним шляхом адаптації [23]. Втім, слід зауважити, що синтез ферментних протеїнів *de novo* робить адаптацію більш тривалою і надійною. В міокарді старих шурів активації редуктазного шляху утворення NO, напевно, не відбувається. Останнє може бути проявом пригнічення здатності гемо- і міоглобінів відновлювати  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  до NO [3]. Разом з тим, наявні дані, що він задіяний у міокарді старих шурів вже за умов фізіологічного спокою. Останнє, на нашу думку, може бути зумовлено розвитком у них тканинної гіпоксії [2].

Інтерпретуючи встановлені розбіжності змін експресії генів і відповідних NO-синтаз зі змінами рівня стабільних метаболітів у досліджених тканинах за своєю спрямованістю, слід враховувати, що регуляція продукції NO клітинами різних тканин за умов фізіологічного спокою і у відповідь на гіпоксію може здійснюватись не тільки на рівні експресії генів та експресії синтезу ферментів, але і шляхом модуляції їх активності (зміни напруги клітинної мембрани, алостерична регуляція  $\text{Ca}^{2+}$ , наявність субстратів і т. д.).

Отже, результати проведених досліджень вказують, що дія гострої нетривалої гіпоксії призводить до значного зростання продукції NO. Про це свідчить підвищення рівня його стабільних метаболітів ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) у міокарді і, особливо, в аортальній стінці шурів обох вікових груп (більш вагоме у дорослих, яке безумовно є адаптивним, проте відбувається різними шляхами). Аналіз одержаних результатів дає всі підстави вважати, що в міокарді дорослих шурів за дефіциту кисню підвищення рівня стабільних метаболітів здійснюється переважно за рахунок активації редуктазного шляху утворення NO і лише частково — шляхом збільшення активності eNOS, яке повністю співпадає в часі з істотним зростанням експресії відповідного гена, а у старих — активації лише iNOS, що також співпадає за часом і за величиною зі зростанням експресії її гена. В аортальній стінці дорослих шурів це здійснюється шляхом помірної і майже такої ж за величиною активації обох ізоформ NO-синтаз і експресії відповідних генів, втім більшою мірою — eNOS; у старих, найвірогідніше — лише значної активації редуктазного шляху утворення NO за стабільної активності обох синтаз і значної експресії лише гена iNOS. Проте не виключено, що в подальшому це сприятиме зростанню також і синтезу ферментних протеїнів *de novo*.

Особливої уваги заслуговує зростання ролі *iNOS* у забезпеченні NO міокарда старих тварин за умов нестачі кисню, оскільки це може мати негативні наслідки. Що стосується збільшення утворення NO в аортальній стінці старих шурів за рахунок посилення реутилізації його стабільних метаболітів, слід враховувати, що нітратредуктазний синтез на відміну від синтезу *de novo* вважається лише тимчасовим, але недовготривалим шляхом адаптації до гіпоксії [4, 13]. Крім того, його активність залежить від величини дефіциту кисню [17]. Останнє відіграватиме істотну роль за дії довготривалої (зокрема, при захворюваннях) або глибокої гіпоксії, сприяючи розвитку ендотеліальної дисфункції. Відомо, що встановлене нами підвищення рівня  $\text{NO}_3^-$ , особливо за зростання активності *iNOS*, є свідченням його утворення неферментативним шляхом при розпаді пероксинітриту і вказує на розвиток окисного стресу. Наслідком останнього буде окисна модифікація ліпідних компонентів мембранних структур клітин і протеїнів. Перше істотно впливатиме на метаболічний стан кардіоміоцитів, а також функціонування *eNOS*, яка має примембранну локалізацію. У свою чергу, зростання окисної модифікації ферментних протеїнів, що містять в активному центрі метали змінної валентності, буде призводити до втрати їх функції. Не можна не враховувати, що окисний стрес часто призводить до зменшення пула NO внаслідок його використання в реакціях нейтралізації дуже реактивного супероксидного радикалу, особливо при старінні. Відомо також, що *iNOS* потребує великої кількості субстрату *L*-аргініну, що може спричинити дефіцит субстрату.

Втім є дані, що свідчать про позитивну роль, яку може відігравати *iNOS* в міокарді, але тільки у віддаленні строки після дії пошкоджуючих чинників або дії довготривалої гіпоксії [7, 18].

### Список використаної літератури

1. Аймашева Н. П., Манухина Е. Б., Пшенникова М. Г. и др. Донор оксида азота повышает, а блокатор NO-синтазы снижает способность организма выполнять тяжелую физическую нагрузку и адаптироваться к ней // Бюл. эксп. биол. мед. — 1998. — **125**, № 4. — С. 381–384.
2. Коркушко О. В., Асанов Э. О., Писарук А. В. и др. Возрастные особенности функции эндотелия и микроциркуляции при гипоксическом стрессе // Кровообіг та гемостаз. — 2007. — № 2. — С. 15–19.
3. Коробов И. М. Біохімія оксиду азоту в нормі та за патологій, що супроводжуються гіпоксичним станом організму // Укр. біохім. журн. — 2002. — **74**, № 4. — С. 101–109.
4. Кульчицький О. К., Потапенко Р. І., Новікова С. М., Бурчинська М. К. Активність процесів перекисного окислення ліпідів та окисної модифікації протеїнів у шурів різного віку за умов дії переривчастої гіпобаричної гіпоксії // Пробл. старения и долголетия. — 2011. — **20**, № 3. — С. 291–301.
5. Маленюк Е. Б., Аймашева Н. П., Манухина Е. Б. и др. Вовлечен ли оксид азота в адаптационную защиту органов от стрессорных повреждений // Бюл. эксп. биол. мед. — 1998. — **126**, № 9. — С. 274–277.
6. Орлова Е. А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности // Укр. журн. эксп. мед. — 2002. — **3**, № 1. — С. 79–82.

7. *Портниченко А. Г., Василенко М. И., Портничко В. И., Мойбенко А. А.* Острая гипоксическая гипоксия (10 % O<sub>2</sub> в азоте) как индуктор отсроченной кардиопротекции у крыс // Гипоксия, автоматизированный анализ гипоксических состояний: Сб. тр. — М., 2005. — Т. 1. — С. 185–190.
8. *Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е.* Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих // Успехи соврем. химии. — 1998. — **35**, № 1. — С. 156–160.
9. *Фролькис В. В., Безруков В. В., Кульчицкий О. К.* Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы. — Киев: Наук. думка, 1994. — 248 с.
10. *Di Giulio C., Bianchi G., Cacchio M. et al.* Oxygen and life span: chronic hypoxia as a model for studying HIF-1 alfa, VEGF and NOS during aging // *Respir. Physiol. Neurobiol.* — 2005. — **147**, № 1. — P. 31–38.
11. *Docherty L. R.* Cardiovascular responses in aging // *Pharmacol. Rev.* — 1990. — **42**. — P. 103–126.
12. *Dong Y., Thompson I. P.* Differential expression of endothelial nitric oxide synthase in coronary and cardiac tissue in hypoxic fetal guinea pig hearts // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2006. — **13**, № 7. — P. 483–490.
13. *Faller D. V.* Endothelial cell responses to hypoxia stress // *Clin. Pharmacol. Physiol.* — 1995. — **26**, № 1. — P. 771–784.
14. *Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J. et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids // *Analyt. Biochem.* — 1982. — **126**. — P. 131–138.
15. *Lundberg J. O., Weitzberg E., Gladwin M. T.* The nitrate-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2008. — **7**, № 8. — P. 710–718.
16. *Marone M., Mozzetti S., De Ritis D. et al.* Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample // *Biol. Proced. Online.* — 2001. — **16**, № 3. — P. 19–25.
17. *McQuillan L. P., Leung G. K., Marsden P. A. et al.* Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms // *Amer. J. Physiol.* — 1994. — **267**, № 5. — P. 1921–1927.
18. *Rebout C., Tanguy S., Gibault A. et al.* Chronic hypoxia exposure depresses aortic endothelium-dependent vasorelaxation in both sedentary and trained rats: involvement of L-arginine // *J. Appl. Physiol.* — 2005. — **99**, № 3. — P. 1029–1035.
19. *Thellin O., Zorzi W., Lakaye B. et al.* Housekeeping genes as internal standards: Use and limits // *J. Biotechnol.* — 1999. — **75**, № 2–3. — P. 291–295.
20. *Valli A., Harris A. L., Kessler B. M.* Hypoxia metabolism in aging // *Aging.* — 2015. — **7**, № 7. — P. 465–466.
21. *Van der Loo B., Labugger R., Kilo J. et al.* Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging // *J. Exp. Med.* — 2000. — **192**, № 12. — P. 1731–1744.
22. *Webb J. D., Coleman M. L., Pugh C. W.* Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing // *Cell Mol. Life Sci.* — 2009. — **66**, № 22. — P. 3539–3554.
23. *Xu X. P., Pollock J. S., Tanner M. A. et al.* Hypoxia activates nitric oxide synthase and stimulates nitric oxide production in porcine coronary resistance arteriolar endothelial cells // *Cardiovasc. Res.* — 1995. — **30**, № 6. — P. 676–680.
24. *Ye. Y., Lin Y., Manickavasagam S. et al.* Pioglitazone protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury in eNOS and iNOS knockout mice // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2008. — **295**, № 6. — P. 2436–2446.



25. *Zaobornyj T., Valdez L. B.* Effects of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium // *J. Appl. Physiol.* — 2005. — **98**. — P. 2370–2375.

Надійшла 10.06.2015

**ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ  
НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ МОНООКСИДА АЗОТА  
В МИОКАРДЕ И СТЕНКЕ АОРТЫ КРЫС РАЗНОГО  
ВОЗРАСТА**

**О. К. Кульчицкий, Р. И. Потапенко, С. Н. Новикова,  
М. К. Бурчинская**

Государственное учреждение "Институт геронтологии  
им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины", 04114 Киев

Анализ результатов, полученных в исследованиях продукции монооксида азота (NO, по уровню стабильных метаболитов), активности NO-синтаз (NOS) и уровня экспрессии соответствующих генов в миокарде и аортальной стенке 15 нелинейных взрослых (6–8 мес) и 15 старых (24–26 мес) крыс-самцов в условиях действия непродолжительной острой гипоксии, позволил установить существенные возрастные и тканевые различия. В миокарде интактных взрослых и старых крыс уровень стабильных метаболитов существенно не отличается, хотя он регистрируется у старых при более низких уровнях ферментной активности и экспрессии гена *eNOS* и неизменной активности *iNOS* при повышении экспрессии ее гена. В аортальной стенке уровень стабильных метаболитов NO при старении существенно снижается (в большей мере  $\text{NO}_2^-$ ) на фоне незначительного падения активности обеих изоформ NOS и стабильного уровня экспрессии их генов. В условиях гипоксии продукция NO возрастает как в миокарде, так и особенно в стенке аорты крыс обеих возрастных групп (более выражено у взрослых) разными путями. В миокарде взрослых крыс это происходит путем повышения активности *iNOS*, а также за счет активации редуктазного компонента цикла NO, у старых — только рост активности *iNOS*, что полностью совпадает с усилением экспрессии ее гена. В аортальной стенке взрослых крыс при этих условиях значительное увеличение (почти в 3 раза) продукции NO происходит путем умеренной и почти одинаковой активации обеих изоформ NOS и экспрессии соответствующих генов, причем в большей мере *eNOS*. У старых крыс увеличение концентрации стабильных метаболитов менее выраженное и происходит за счет как  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  и регистрируется при отсутствии изменения активности обеих NOS и возрастании уровня экспрессии гена *iNOS*.

**EFFECTS OF ACUTE HYPOBARIC HYPOXIA  
ON THE STATE OF NITRIC OXIDE SYSTEM  
IN THE MYOCARDIUM AND AORTIC WALL OF RATS  
OF DIFFERENT AGE**

**O. K. Kulchitsky, R. I. Potapenko, S. N. Novikova,  
M. K. Burchinskaia**

State Institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology  
NAMS Ukraine", 04114 Kyiv

Analysis of results of study of production of nitric oxide (NO, based on the level of stable metabolites), NO synthases activity and the level of expression of related genes in the myocardium and aortic wall in 15 outbred adult (6–8 mo.) and 15 old (24–26 mo.) male rats in conditions of effect of short-term acute hypoxia revealed significant age- and tissue-related differences. There were no significant differences in the level of stable metabolites in the myocardium of adult and old rats, though it was registered in old rats at lower levels of enzyme activity and expression of eNOS gene and unchanged activity of iNOS at the increase of expression of its gene. There was a significant decrease in level of stable metabolites of NO in aortic wall (mostly  $\text{NO}_2^-$ ) against the background of insignificant decrease in the activity of both NOS isoforms and stable level of expression of their genes. In hypoxia the NO production increased in both myocardium and particularly in the aortic wall of rats of both age groups (being more pronounced in adults) and proceeded in different ways. In the myocardium of adult rats it occurred through the increase in iNOS activity, as well as at the expense of activation of reductase component of NO cycle and in old rats through the rise of iNOS activity only, which fully corresponded to the enhancement of expression of its gene. In these conditions a significant increase (almost 3-fold) of NO production in the aortic wall occurred through moderate and almost similar activation of both NOS isoforms and expression of related genes, that of eNOS being more significant. An increase of concentration of stable metabolites was less marked in old rats; it occurred at the expense of both  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  being registered in the absence of changes in the activity of both NOS and increase in the level of iNOS gene expression.

**Відомості про авторів**

**Лабораторія регуляції метаболізму**

О. К. Кульчицький — зав. лаб., д.м.н., професор

О. К. Потапенко — пров.н.с., к.м.н.

С. М. Новікова — гол.н.с., д.м.н. (biochem@geront.kiev.ua)

М. К. Бурчинська — с.н.с., к.б.н.