

Є.В. Стрелков, О.С. Хромов

Гіпоксична легенева гіпертензія: роль фосфатидилхолінспецифічної фосфоліпази С

Метою роботи було вивчення ролі фосфатидилхолінспецифічної фосфоліпази С (ФХ-ФЛС) у розвитку гіпоксичної легеневої гіпертензії. Підвищення систолічного тиску у правому шлучноку серця під впливом гіпоксичної гіпоксії мало двофазний характер. Перша фаза становила 5,4 хв ± 0,9 хв, друга спостерігалася протягом всієї гіпоксичної гіпоксії. Блокада конститутивної NO-синтази за допомогою L-NAME (25 мг/кг; внутрішньовенно) не викликала змін характеру гіпоксичної реакції, проте тиск у правому шлучноку був вищим. Ці результати, ймовірно, вказують на малу залученість NO-синтази у розвиток гіпоксичної легеневої вазоконстрикції. На тлі блокади протеїнкінази С за допомогою хелеритрину (0,5 мг/кг; внутрішньовенно) повністю усувалася перша та на 40 % пригнічувалася друга фаза реакції. Блокатор ФХ-ФЛС D609 (5 мг/кг; внутрішньовенно) призводив до повного пригнічення гіпоксичної легеневої гіпертензії. Отриманні результати свідчать про можливу ключову роль ФХ-ФЛС у виникненні та розвитку гіпоксичної легеневої гіпертензії.

Ключові слова: гіпоксія, легенева гіпертензія, фосфатидилхолінспецифічна фосфоліпаза С.

ВСТУП

Механізми розвитку гіпоксичної легеневої гіпертензії ще далекі від повного розуміння. Вважається, що в основі її лежить гіпоксична легенева вазоконстрикція [11]. Дані інших дослідників дають змогу припустити наявність зв'язку між гіпоксичною легеневою вазоконстрикцією та активністю фосфатидилхолінспецифічної фосфоліпази С (ФХ-ФЛС). Остання знаходиться у мембранах ендотеліоцитів і міоцитів та опосередковує констрикторні відповіді гладеньком'язових клітин судин [5, 13, 14, 20]. У дослідженнях на ізольованих легенях шурів було показано, що активація ФХ-ФЛС призводить до розвитку легеневої гіпертензії [20]. Крім того, підвищення утворення реактивних форм кисню (РФК) у клітині (що вважається пусковим фактором гіпоксичної легеневої вазоконстрикції) стимулює активність ФХ-ФЛС [14, 19]. Водночас за іншими даними сама активація ФХ-ФЛС викликає підвищення вмісту РФК у кліти-

© Є.В. Стрелков, О.С. Хромов

нах ендотелію [6]. На можливу причетність ФХ-ФЛС до гіпоксичної легеневої вазоконстрикції вказує пригнічення індукованої гіпоксією транслокації протеїнкінази С під впливом блокатора ФХ-ФЛС D609 [8]. Проте нез'ясованим залишається питання про залежність кожної з фаз гіпоксичної легеневої вазоконстрикції від активності протеїнкінази С [4, 12, 18].

Є підстави припустити, що ще однією ланкою у механізмі розвитку гіпоксичної легеневої вазоконстрикції є система оксиду азоту, але наявні дані про його роль при гіпоксії суперечливі [9–11, 17].

Метою нашого дослідження було з'ясування ролі ФХ-ФЛС у розвитку та перебігу гіпоксичної легеневої гіпертензії.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 35 дорослих щурах-самцях масою 270 г ± 40 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Всі маніпуляції з тваринами

проводили відповідно до Закону України № 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” [1], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин [7], які використовуються в експериментальних дослідженнях. Тварини були поділені на 7 груп по 5 тварин у кожній. У щурів контрольної групи відтворювали легеневу вазоконстрикцію створенням гіпоксичної гіпоксії. Для уточнення характеру впливу на показники кровообігу в умовах нормоксії тваринам 2-ї, 3-ї та 4-ї груп відповідно вводили внутрішньовенно: блокатор синтази оксиду азоту метиловий ефір N-нітро-L-аргініну (L-NAME; 25 мг/кг), блокатор протеїнкінази С хелеритрин (0,5 мг/кг) і блокатор ФХ-ФЛС С D609 (5 мг/кг). Тваринам 5-ї, 6-ї та 7-ї груп перед переведенням на дихання гіпоксичної газовою сумішшю відповідно вводили: L-NAME – за 15 хв, хелеритрин – за 20 хв і D609 – за 30 хв до початку гіпоксії.

Дослідження проведені на тваринах під внутрішньочеревним хлоралозо-уретановим наркозом (1:10; з розрахунку 40 мг уретану на 100 г маси тіла). Виконували трахеостомію. Ліву яремну вену та ліву загальну сонну артерію катетеризували тефлоновими катетерами, при цьому вводили гепарин з розрахунку 50 од. на 100 г маси тіла. Враховуючи складнощі ретроградної катетеризації легеневого стовбура у дрібних тварин, проводили катетеризацію порожнини правого шлуночка через праву яремну вену. Як відомо, систолічний тиск у легеневому стовбурі такий самий, як у правому шлуночку [2]. Під шкірою живота розміщували хлоросрібний, а в м’язи внутрішньої поверхні стегна вводили платиновий полярографічний електрод. Через 20–30 хв після закінчення операційної підготовки, яка необхідна для стабілізації кровообігу, реєстрували вихідні показники. Далі у тварин контрольної групи викликали гіпоксичну гіпоксію, іншим тваринам вводили відповідні речовини. Тривалість спостереження в умовах нормоксії становила 1,5 год.

Гіпоксичну гіпоксію викликали штучною вентиляцією легень тварини газовою сумішшю, що містила 10 % O₂ та 90 % N₂ (апарат Ugo Basile 7025; хвилинний об’єм дихання близько 140 мл/хв). Тривалість гіпоксії – 120 хв.

Визначали систолічний тиск у правому шлуночку серця і в сонній артерії за допомогою датчиків тиску ISOTEC (“HSE”, Німеччина). Розраховували середній артеріальний тиск (САТ). Реєстрацію та обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення “Chart 5” (“ADInstruments”, Австралія).

Електрохімічне (полярографічне) визначення напруги кисню в скелетних м’язах тварин (pO_{2m}) [3] проводили за допомогою полярографа РА 3 (Чехія).

Були використані речовини виробництва “Sigma” (США): L-NAME гідрохлорид, хелеритрин, D609, уретан, хлоралоза.

Тварин виводили з експерименту введенням уретану (400 мг/100 г, внутрішньовенно).

Результати досліджень наведені у вигляді $M \pm m$. Для визначення ймовірності похибки їх обробляли за допомогою методів варіаційної статистики з використанням непараметричного тесту Манна-Уїтні. Статистично значущими вважали зміни в довірчому інтервалі не менше ніж 95 % або $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

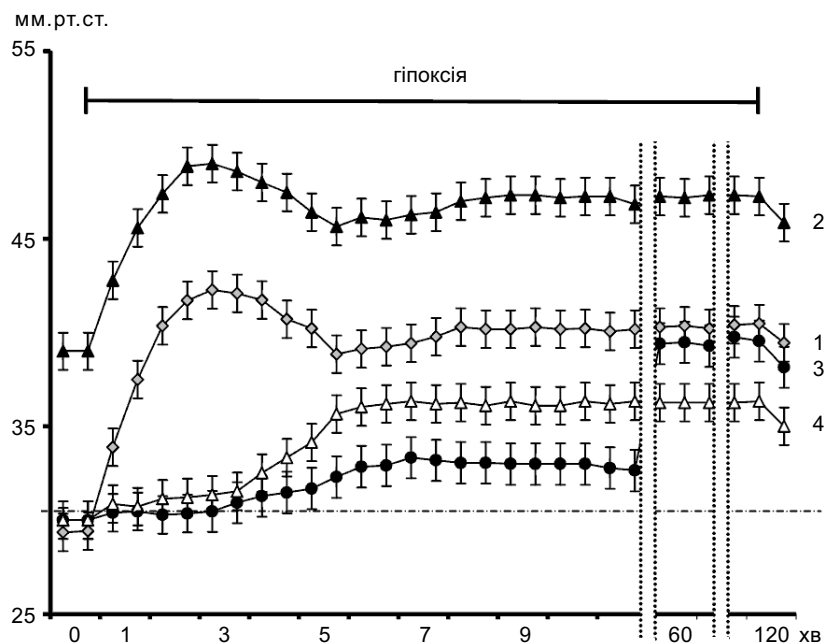
Початковий систолічний тиск у правому шлуночку серця (сТПШ) становив 30 мм рт.ст. \pm 1 мм рт.ст. Вже через 1,5–2 хв вентиляції легень гіпоксичною газовою сумішшю у тварин розвивалася легенева гіпертензія та системна гіпотензія. Підвищення тиску у 3 з 5 тварин мало виражений двофазний характер, у решти тварин чітка межа між фазами не проявлялася. Перша фаза спостерігалася протягом 5,4 хв \pm 0,9 хв від початку гіпоксії. Пікове значення сТПШ під час цього періоду у тварин контрольної

групи було зафіксоване на $2,4 \text{ хв} \pm 0,2 \text{ хв}$ гіпоксії і становило $42 \text{ мм рт.ст.} \pm 1 \text{ мм рт.ст.}$ ($P < 0,001$). Під час другої фази через $7,6 \text{ хв} \pm 0,7 \text{ хв}$ від початку гіпоксії розвивалася стійка легенева гіпертензія, що спостерігалася протягом всього періоду гіпоксії. сТПШ при цьому становив $40 \text{ мм рт.ст.} \pm 1 \text{ мм рт.ст.}$ ($P < 0,001$), що на 33 % вище від вихідного рівня (рисунок). Під впливом гіпоксії САТ знижувався на 38 % (з 109 ± 4 до $68 \text{ мм рт.ст.} \pm 5 \text{ мм рт.ст.}$; $P < 0,01$), а напруження кисню в м'язовій тканині – більш ніж удвічі (з 34 ± 1 до $15 \text{ мм рт.ст.} \pm 1 \text{ мм рт.ст.}$; $P < 0,01$). У зв'язку з наявністю двофазної реакції у більшості тварин надалі ми будемо наводити значення сТПШ на 3-тю та 10-ту хвилини гіпоксії.

Введення тваринам L-NAME на тлі нормоксії через 10 хв призводило до стійкої легеневої та системної гіпертензії (таблиця). Гіпоксія викликала подальше підвищення тиску. Так, сТПШ становив $49 \text{ мм рт.ст.} \pm 1 \text{ мм рт.ст.}$ на 3-й хвилині ($P < 0,01$, порівняно з гіпоксією) та $47 \text{ мм рт.ст.} \pm 1 \text{ мм}$

рт.ст. на 10-й хвилині гіпоксії ($P < 0,01$), що на 18 % вище, ніж у тварин контрольної групи. САТ під впливом гіпоксії знижувався (до $81 \text{ мм рт.ст.} \pm 4 \text{ мм рт.ст.}$), але залишався вищим, ніж у тварин контрольної групи ($P < 0,01$). Напруження кисню в м'язовій тканині на тлі введення L-NAME знижувалося до $12 \text{ мм рт.ст.} \pm 1 \text{ мм рт.ст.}$ ($P < 0,01$). Ефект L-NAME зберігався протягом усіх 120 хв спостереження (див. рисунок).

Введення хелеритрину в умовах нормоксії не призводило до суттєвих змін показників кардіо- та гемодинаміки і pO_{2m} (див. таблицю). Під впливом хелеритрину повністю усувалася перша фаза гіпоксичної реакції, при цьому сТПШ становив $31 \text{ мм рт.ст.} \pm 1 \text{ мм рт.ст.}$ ($P > 0,05$, порівняно з вихідним значенням). Підвищення сТПШ починалося лише на $(3,1 \pm 0,5)$ хвилині гіпоксії. На 10-й хвилині цей показник становив $36 \text{ мм рт.ст.} \pm 1 \text{ мм рт.ст.}$ ($P < 0,05$), що 10 % нижче, ніж у тварин контрольної групи. Такий тиск надалі зберігався протя-



Вплив метилового ефіру N-нітро-L-аргініну (L-NAME), хелеритрину та D609 на тиск у правому шлуночку серця при гіпоксії: 1 – гіпоксична гіпоксія, 2 – гіпоксична гіпоксія на тлі введення L-NAME, 3 – гіпоксична гіпоксія на тлі введення D609, 4 – гіпоксична гіпоксія на тлі введення хелеритрину. Пунктирною лінією позначено рівень систолічного тиску в правому шлуночку при нормоксії

гом усього періоду спостереження. Значення САТ та pO_{2m} при гіпоксії на тлі введення хелеритрину статистично не відрізнялися від контролю (65 ± 3 та 15 мм рт.ст. ± 1 мм рт.ст. відповідно; див. рисунок).

Введення D609 не впливало на показники кардіо-, гемодинаміки та pO_{2m} . (див. таблицю). Він повністю усував розвиток гіпоксичної легеневої гіпертензії (див. рисунок). На 3-й хвилині гіпоксії сТПШ становив 30 мм рт.ст. ± 1 мм рт.ст. ($P < 0,01$, порівняно зі значеннями отриманими при гіпоксії), а на 10-й хвилині – 33 мм рт.ст. ± 1 мм рт.ст. ($P < 0,01$). Ефект D609 зберігався протягом 64 хв ± 5 хв. При гіпоксії він не впливав на САТ та pO_{2m} . САТ становив 60 мм рт.ст. ± 6 мм рт.ст., а pO_{2m} – 15 мм рт.ст. ± 1 мм рт.ст.

Добре відомим є двофазний характер реакції ізольованих легеневих судин на гіпоксію. Перша фаза (транзиторна) – це результат швидкого підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в цитоплазмі гладеньком'язових клітин судин. Її пік припадає на 2–4-ту хвилину гіпоксії [15]. Друга фаза (тривала) зберігається протягом усього періоду гіпоксії і звичайно спостерігається тільки при наявності неушкодженого ендотелію легеневих судин. Вона, ймовірно, пов'язана з підвищенням чутливості скоротливого апарату гладеньком'язових клітин легеневих артерій до іонів кальцію [15, 16]. Як зазначалося, під впливом гіпоксії у більшості щурів спостерігалось двофазне підвищення сТПШ. За часовими межами та

за приростом тиску ці фази відповідали фазам гіпоксичної легеневої вазоконстрикції, що спостерігається у дослідженнях на ізольованих легеневих артеріях. Отже, на наш погляд, перша та друга фази підвищення сТПШ під впливом гіпоксії є проявом відповідних фаз гіпоксичної легеневої вазоконстрикції на системному рівні. У деяких тварин чіткого розділення реакції на фази не спостерігалось, що, можливо, пов'язано з асинхронним скороченням легеневих артерій у різних ділянках легень.

Повне відтворення характеру гіпоксичної легеневої вазоконстрикції, а також збереження приросту сТПШ від відповідного початкового рівня при гіпоксичній гіпоксії на тлі дії L-NAME говорить про невелику залученість синтази NO у розвитку гіпоксичної легеневої вазоконстрикції. Про це свідчать дані інших досліджень [11].

Результати, отримані в дослідженнях з блокадою протеїнкінази C підтверджують гіпотезу про те, що її активація є важливим фактором розвитку транзиторної фази гіпоксичної легеневої вазоконстрикції. Відомо, що протеїнкіназа C здатна активувати кальцієві канали L-типу, що призводить до швидкого підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca_{2+} [18]. Крім того, отримані результати дозволяють припустити, що протеїнкіназа C деякою мірою залучена і до тривалої фази гіпоксичної легеневої вазоконстрикції. Можливо, це відбувається через підвищення чутливості скоротливого апарату гладеньком'язових клітин легеневих артерій до іонів кальцію

Влив D609, хелеритрину та метилового ефіру N-нітро-L-аргініну (L-NAME) на тиск у правому шлуночку серця, середній артеріальний тиск і напруження кисню у скелетних м'язах ($M \pm m$, $n = 15$)

Схема досліджу	Середній артеріальний тиск, мм рт.ст.	Систолічний тиск у правому шлуночку серця, мм рт.ст.	Напруження кисню у скелетних м'язах, мм рт.ст.
Нормоксія	30 ± 1	109 ± 4	34 ± 1
Нормоксія та L-NAME	39 ± 1 *	151 ± 3 *	27 ± 2
Нормоксія та хелеритрин	31 ± 1	103 ± 4	33 ± 1
Нормоксія та D609	31 ± 1	108 ± 9	34 ± 1

* $P < 0,01$.

внаслідок пригнічення фосфатази легких ланцюгів міозину [18], оскільки відомо, що внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах легеневих судин під час тривалої фази гіпоксичної легеневої вазоконстрикції залишається на сталому рівні [15, 16].

Попередження розвитку гіпоксичної легеневої гіпертензії під впливом D609 вказує на ключову роль ФХ-ФЛС у розвитку гіпоксичної легеневої вазоконстрикції. З отриманих результатів можна зробити висновок, що активація протеїнкінази С при гіпоксії відбувається саме під впливом ФХ-ФЛС (але не фосфотидилінозитолзалежної фосфоліпази С), що і зумовлює розвиток транзиторної фази гіпоксичної легеневої вазоконстрикції. Як зазначалося, ФХ-ФЛС бере участь у передачі внутрішньоклітинного сигналу в гладеньком'язових клітинах судин під впливом багатьох вазоконстрикторів (серотоніну, ангіотензину, ендотеліну тощо). Ймовірно, під час тривалої фази гіпоксичної легеневої вазоконстрикції ФХ-ФЛС опосередковує вплив на гладеньком'язові клітини легеневих судин ендотеліалозалежного вазоконстрикторного фактора, природа якого поки що залишається невідомою [16]. На наш погляд, роль ФХ-ФЛС у розвитку гіпоксичної легеневої вазоконстрикції потребує подальшого вивчення.

Таким чином, результати досліджень, проведених на рівні цілісного організму, вказують на можливу ключову роль ФХ-ФЛС у виникненні гіпоксичної легеневої вазоконстрикції.

Е.В. Стрелков, А.С. Хромов

ГИПОКСИЧЕСКАЯ ЛЕГОЧНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ: РОЛЬ ФОСФАТИДИЛХОЛИНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С

Целью работы было изучение роли фосфатидилхолин-специфической фосфолипазы С (ФХ-ФЛС) в развитии гипоксической легочной гипертензии. Повышение систолического давления в правом желудочке сердца под влиянием гипоксической гипоксии носило двофазный

характер. Первая фаза составляла $5,4 \pm 0,9$ мин, вторая – наблюдалась в течение всей гипоксии. Блокада конститутивной NO-синтазы с помощью L-NAME (25 мг/кг; внутривенное) не вызывала изменений характера гипоксической реакции, а абсолютные величины давления в правом желудочке были более высокими. Эти результаты, вероятно, указывают на малую вовлеченность NO-синтазы в развитие гипоксической легочной вазоконстрикции. На фоне блокады протеинкиназы С с помощью хелеритрина (0,5 мг/кг; внутривенное) полностью устранялась первая фаза и на 40 % угнеталась вторая фаза реакции. Блокатор ФХ-ФЛС D609 (5 мг/кг; внутривенное) приводил к полному подавлению гипоксической легочной гипертензии. Полученные результаты свидетельствуют о возможной ключевой роли ФХ-ФЛС в возникновении и развитии гипоксической легочной гипертензии.

Ключевые слова: гипоксия, легочная гипертензия, фосфатидилхолинспецифическая фосфолипаза С.

I.V. Strielkov, A.S. Khoromov

HYPoxic PULMONARY HYPERTENSION: THE ROLE OF PHOSPHATIDYLCHOLINE-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C

The aim of the study was to investigate the role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) in the development of hypoxic pulmonary hypertension. Induction of hypoxic hypoxia in rats resulted in a biphasic increase in systolic right ventricular pressure (RVP). The first phase was transient (5.4 ± 0.9 min), while the second phase was sustained and persisted during the whole time course of hypoxia (120 min). An inhibition of cNOS with L-NAME (25 mg/kg; i/v) did not cause any change in the nature of the hypoxic reaction, despite the RVP values were significantly higher in normoxia and hypoxia. These results demonstrate that NO synthase is not substantially involved in the hypoxic pulmonary vasoconstriction. Injection of PKC inhibitor chelerythrine (0.5 mg/kg; i/v) prevented the development of the first phase of the RVP increase and reduced the second phase by 40%. An inhibition of PC-PLC with D609 (5 mg/kg; i/v) completely abolished pulmonary hypertension. The results obtained suggest that PC-PLC possibly plays a key role in the development and maintenance of hypoxic pulmonary hypertension. Key words: hypoxia, pulmonary hypertension, phosphatidylcholine-specific phospholipase C.

Institute of pharmacology and toxicology AMS of Ukraine, Kyiv.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Закон України № 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 230.
2. Каро К., Педли Т., Шротер Р., Сид У. Механика кровообращения. – М.: Мир, 1981. – 624 с.

3. Коваленко Е.А., Березовский В.А., Эпштейн И.М. Полярнографическое определение кислорода в организме. – М.: Медицина, 1975. – 231 с.
4. Barman S. A. Effect of protein kinase C inhibition on hypoxic pulmonary vasoconstriction // Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2001. – **280**. – P. L888–L895.
5. Barnett R. L., Ruffini L., Ramsammy L. et al. Nord cGMP antagonizes angiotensin-mediated phosphatidylcholine hydrolysis and C kinase activation in mesangial cells // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 1995. – **268**, №2. – P. C376–C38.
6. Cheng Y., Zhao Q., Liu X. et al. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, p53 and ROS in the association of apoptosis and senescence in vascular endothelial cells // FEBS Lett. – 2006. – **580**, №20. – P. 4911–4915.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
8. Goldberg M., Zhang H.L., Steinberg S.F. Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes // J. Clin. Invest. – 1997. – **99**, №1. – P. 55–61.
9. Greenberg B., Kishiyama S. Endothelium-dependent and -independent responses to severe hypoxia in rat pulmonary artery // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 1994. – **265**. – P. H1712–H1720.
10. Karamsetty V.S., MacLean M.R., McCulloch K.M. Hypoxic constrictor response in the isolated pulmonary artery from chronically hypoxic rats // Respir. Physiol. – 1996. – **105**. – P. 85–93.
11. Leach R.M., Robertson T.P., Twort C.H.C., Ward J.P.T. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries // Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 1994. – **266**. – P. L223–L231.
12. Littler C.M., Morris K.G., Fagan K.A. et al. Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2003. – **284**. – P. H1321–H1331.
13. Liu G.L., Shaw L., Heagerty A.M. et al. Endothelin-1 stimulates hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipases C and D in intact rat mesenteric arteries // J. Vasc. Res. – 1999. – **36**. – №1. – P.35–46.
14. Liu H., Zhang H., Forman H.J. Silica Induces Macrophage Cytokines through Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C with Hydrogen Peroxide // Amer. J. Resp. Cell Mol. Biol. – 2007. – **36**. – P. 594–599.
15. Robertson T.P., Aaronson P.I., Ward J.P.T. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca²⁺ in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca²⁺ sensitization // Amer. J. Physiol. – 1995. – **268**. – P. H301–H307.
16. Robertson T.P., Aaronson P.I., Ward J.P.T. Ca²⁺ sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent // Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2003. – **284**, №6. – P. L1121–L1126.
17. Salameh G., Karamsetty M.R., Warburton R.R. et al. Differences in acute hypoxic pulmonary vasoresponsiveness between rat strains: role of endothelium // J. Appl. Physiol. – 1999. – **87**. – P. 356–362.
18. Ward J.P.T, Knock G.A., Snetkov V.A., Aaronson P.I. Protein kinases in vascular smooth muscle tone – role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction // Pharmacol. and Therap. – 2004. – **104**. – P. 207–231.
19. Ward J.P.T., Snetkov V.A., Aaronson P.I. Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation // Cell Calcium. – 2004. – **36**. – P. 209–220.
20. Witzernath M., Ahrens B., Kube1 S.M. et al. Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness // Eur. Respir. J. – 2006(Mar). – **28**. –P. 370–377.

ДУ “Ін-т фармакології та токсикології АМН України”; Київ
E-mail: juginst@yahoo.co.uk

Матеріал надійшов до редакції 14.07.2009