

УДК 612.111.11+612.233

## ВПЛИВ ГІПОКСИЧНОЇ ГІПОКСІЇ НА ДИНАМІКУ СИНТЕЗУ МІОГЛОБІНУ У СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗАХ ЩУРІВ

**О. Коробова В. Коробов**

*Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна,  
e-mail: [biolog@franko.lviv.ua](mailto:biolog@franko.lviv.ua)*

Методом конкурентної молекулярної гібридизації показано, що гіпоксичний стрес супроводжується деградацією міоглобінової мРНК у скелетних м'язах щурів. У цьому разі спостерігається зменшення вмісту міоглобіну. За тривалої адаптації до нестачі O<sub>2</sub> активується експресія гена Mb і генів, які в нормі не експресуються.

*Ключові слова:* міоглобін (Mb); гіпоксична гіпоксія; експресія міоглобінового гену.

Міоглобіну належить особлива роль у адаптації організму до нестачі кисню (O<sub>2</sub>). Давно з'ясовано, що адаптація до гіпоксії і до фізичних навантажень супроводжується збільшенням вмісту цього дихального гемопротейду в червоних волокнах скелетних м'язів [7]. Проте дотепер пір не досліджені закономірності експресії міоглобінового гену в динаміці адаптації нестачі O<sub>2</sub>. Тому метою нашого дослідження стало вивчення експресії міоглобінового гену за короткотривалої і тривалої дії гіпоксичної гіпоксії.

Динаміку синтезу Mb вивчали шляхом визначенням його концентрації спектрофотометричним методом [3]. Молекулярну гібридизацію виконували, використовуючи ДНК скелетних м'язів щурів, попередньо адаптованих до гіпоксичної гіпоксії протягом 30 діб (7000 м 5 год щоденно); κДНК, яку отримували в реакції зворотної транскрипції, використовуючи сумарну фракцію полі-А-РНК із скелетних м'язів, адаптованих до гіпоксії щурів [5]; κДНК, яку отримували так само, використовуючи сумарну фракцію РНК з скелетних м'язів інтактних щурів (κДНК<sub>н</sub>); полі-А-РНК із скелетних м'язів адаптованих до гіпоксії щурів (κДНК<sub>г</sub>). У варіантах гібридизації використовували мічену радіоактивним фосфором (<sup>32</sup>P) по 5' кінцю κДНК, отриманих у реакції зворотної транскрипції фракції РНК із м'язів адаптованих до гіпоксії щурів і аналогічно мічену κДНК, отриману на фракції РНК із м'язів інтактних щурів [11]. Сумарну РНК виділяли з заморожених тканин гуанідинізоціанатним методом [13]. Полі-А-вмісну РНК відділяли від інших видів РНК хроматографічно на оліго-(dT)-целюлозі ("Reanal") [8].

В основі використаного нами методу конкурентної гібридизації лежить здатність мічених і немічених кДНК конкурувати за місце посадки на матриці ДНК залежно від ступеня гомологічності їх нуклеотидних послідовностей. Реакційна суміш містила  $^{32}\text{P}$ -міченої кДНК, отриману на полі-А-РНК із скелетних м'язів попередньо адаптованих до гіпоксичної гіпоксії щурів ( $^{32}\text{p}$ -кДНК<sub>r</sub>) та кДНК (кДНК<sub>n</sub>), отриману на полі-А-РНК із скелетних м'язів інтактних тварин у різних варіантах дослідження, використовуючи такі співвідношення: 1:0; 1:1; 1:10; 1:50–100 відповідно, а також  $^{32}\text{P}$ -міченої кДНК, отриману на полі-А-РНК із скелетних м'язів інтактних щурів ( $^{32}\text{p}$ -кДНК<sub>r</sub>) та кДНК (кДНК<sub>r</sub>), отриману на полі-А-РНК з скелетних м'язів попередньо адаптованих до гіпоксичної гіпоксії інтактних тварин в таких же співвідношеннях. Як зонди використовували синтетичний олігонуклеотид, комплементарний консервативній ділянці гена міоглобіна, що несе інформацію про первинну структуру ділянки білка в області 133–139 амінокислотних залишків, а також ген міоглобіна тюленя, вшитий в плазмиду рBR-322, люб'язно наданої Blanshettod (Англія) [14].

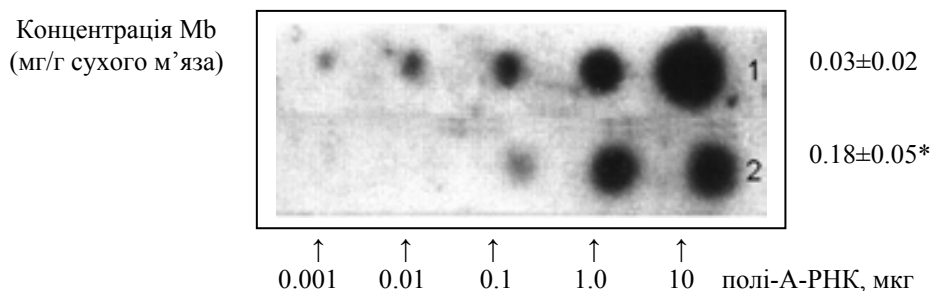


Рис. 1. Радиоавтографи гібридів кДНК міоглобінового гену із сумарними полі-А-РНК скелетних м'язів задніх кінцівок інтактних щурів (1), щурів із одноразовим впливом гіпоксичної гіпоксії (4 год при  $\text{pO}_2$  56 мм рт. ст.) (2)

На рис. 1 зображено радиоавтографи продуктів гібридизації фракції полі-А-РНК, отриманих із скелетних м'язів задніх кінцівок після одноразового перебування в барокамері, де  $\text{pO}_2$  становив 56 мм рт. ст., із кДНК міоглобінового гена. З представлених ретенограм видно, що кількість радіоактивного матеріалу в молекулярних гібридах зменшується в усіх серіях гібридизації у межах концентрацій 10,0–0,1 мкг введеної у реакцію полі-А-РНК, а при концентрації полі-А-РНК 0.01 мкг радіоактивний сигнал не виявлено. Оскільки в реакцію гібридизації були задіяні сумарна фракція полі-А-РНК і кДНК, комплементарна гену Mb, то припустимо, що зменшення радіоактивного сигналу у продуктах гібридизації після одноразового впливу гіпоксичного фактору зумовлено пригніченням експресії Mb

гену, або прискоренням деградації міоглобінових мРНК через активацію РНК-аз. Одночасно ми спостерігали зменшення концентрації Mb у скелетних м'язах піддослідних тварин. Наприклад, якщо в нормі вміст Mb становить  $0.30 \pm 0.02$  мг/г, то після гіпоксичного стресу –  $0.18 \pm 0.05$  мг/г сухої ваги м'яза. Цей факт свідчить про можливість дії нестачі  $O_2$  у повітрі, яким дихають, на трансляційний апарат міоцитів скелетних м'язів піддослідних тварин.

Ймовірно, що за умов гіпоксичного стресу присутні всі перераховані вище механізми. Яким би не був механізм тимчасового припинення процесів утворення Mb у міоцитах скелетних м'язів тварин за умов дії гіпоксичного фактору, це явище вважаємо позитивним, оскільки за сучасними уявленнями про механізми формування адаптації на молекулярному рівні процеси біодеградації відіграють значну роль [1]. Якщо враховувати те, що м'язи порівняно з іншими тканинами мають відносно високу резистентність до нестачі  $O_2$ , то вибіркова біодеградація Mb і тимчасове припинення експресії саме його гену – процес цілком доцільний. Про це може свідчити недавно виявлений той факт, що лабораторні миші з “нокаут-ваним” геном Mb не відрізняються за основними фізіологічними показниками від звичайних мишей [2].

Можна припустити, що пригнічення синтезу й зменшення вмісту Mb у м'язах у терміновий період адаптації до гіпоксії своєрідне “жертвоприношення” на користь мозку, для якого обмеження у постачанні  $O_2$  пов'язані з розвитком необернених критичних процесів.

Виявлене нами пригнічення синтезу Mb у міоцитах скелетних м'язів щурів за гіпоксичного стресу аналізу, які зображені на рис. 2. Видно, що радіоактивний сигнал у молекулярних супроводжується експресією генів, які в нормі неактивні. Про це свідчать результати гібридизаційного гібрида із співвідношенням введених у гібридизацію  $^{32}P$ -кДНК<sub>н</sub> (помічена радіоактивним фосфором, комплементарна до РНК, виділеної з м'язів інтактних щурів): кДНК<sub>г</sub> (немічена кДНК, комплементарна до РНК, виділеної з м'язів щурів, що піддавались дії гіпоксичного фактору) – 1:0; 1:1; 1:10 не змінюється. При співвідношенні  $^{32}P$ -кДНК<sub>н</sub>:кДНК<sub>г</sub> 1:100 за наявності в гібридизаційній суміші фракції полі-А-РНК, виділеної з м'язів тварин, що піддавались гіпоксичному стресу, в гібридах спостерігається зменшення радіоактивного сигналу. Ці результати свідчать про те, що в м'язах тварин під впливом гіпоксичного фактору з'являються якісно нові полі-А-РНК, що, очевидно, пов'язане з активацією транскрипції ділянок геному, які не експресуються в нормі. Продукти експресії індукованих нестачею  $O_2$  генів, утворюючи молекулярні гібриди з кДНК, зменшують кількість гібридизаційного матеріалу в реасоціатах  $^{32}P$ -кДНК<sub>н</sub> – кДНК<sub>г</sub> а отже, зменшується кількість радіоактивного матеріалу за даних умов гібридизації.

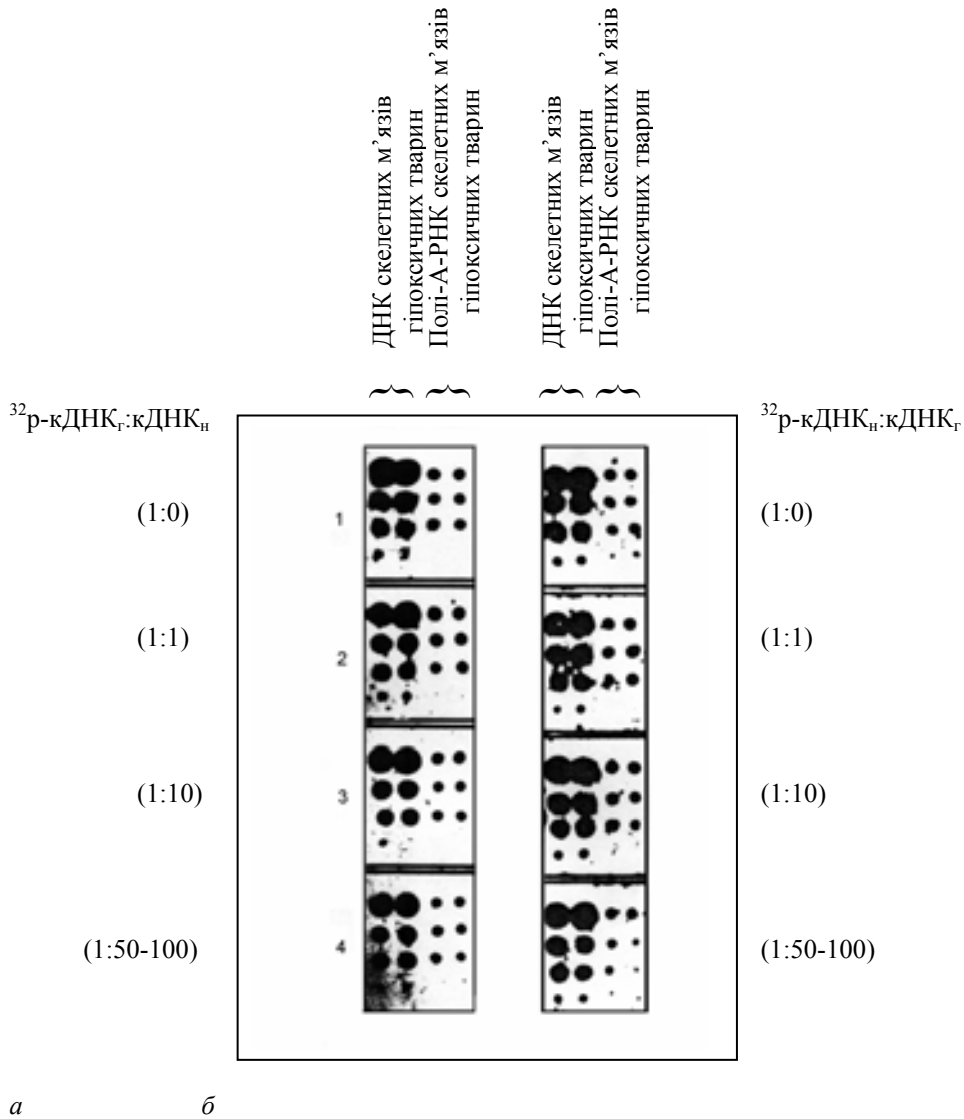


Рис. 2. Радиоавтографи конкурентної гібридизації: *a* –  $^{32}\text{p-кДНК}$  щурів, адаптованих до гіпоксії з полі-А-РНК, виділеної з м'язів щурів за наявності кДНК інтактних щурів; *б* – кДНК щурів, адаптованих до гіпоксії з полі-А-РНК, виділеної з м'язів щурів за наявності  $^{32}\text{p-кДНК}$  інтактних щурів

Про швидку експресію генів, які не експресуються у нормі, під впливом гіпоксії відмічено у низці праць [4, 10].

Вважають, що активація ранніх генів є неспецифічним ланцюгом адаптації до гіпоксії і супроводжується збільшенням білків родини HSP-70 [9], які відіграють важливу роль у захисті клітин від шкідливих ефектів дефіциту O<sub>2</sub>. Показано, що вихідна висока продукція HSP-70 у трансгенних тварин підвищує стійкість органів до гіпоксичних ушкоджень [15].

Дослідження останніх років показали, що активатором синтезу HSP-70 є оксид азоту, утворення якого при гіпоксії активується [15].

Отже, ймовірно, що встановлені нами зміни в експресії генів під впливом нестачі O<sub>2</sub>, зумовлені NO-активацією синтезу родини білків HSP-70.

1. *Блехман Г.И.* Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // *Успехи совр. биол.* 1992. Т. 112. № 2. С. 281–297.
2. *Виноградов А.Д.* Зачем нужен миоглобин? // *Биохимия.* 2000. Т. 64. № 5. С. 709–710.
3. *Голенда И.Л., Кричевский А.Л.* Быстрый метод определения миоглобина в биологических жидкостях // *Лаб. Дело.* 1977. № 1. С. 21–23.
4. *Зенина Т.А., Голубева Л.Ю., Салтыкова В.А. и др.* NO-зависимые механизмы адаптации к гипоксии // *Известия РАН. Сер. биол.* 1998. № 4. С. 505–512.
5. *Кавсан В.М.* Синтез ДНК, комплементарной мРНК эукариотов // *Методы молекулярной биологии.* К., 1979. С. 201–213.
6. *Комолова Г.С., Егорова И.А.* Особенности транскрипционной активности ядерной ДНК печени при длительной адаптации к высотной гипоксии // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1985. № 1. С. 25–30.
7. *Коробов В.М., Голубий Е.М.* Роль миоглобина в адаптации мышечной системы к физическим нагрузкам и гипоксии // *Успехи совр. биол.* 1993. Т. 113. № 1. С. 60–70.
8. *Коробов В.Н., Рачков А.Э., Стародуб Н.Ф.* Выделение поли-А-содержащей РНК из скелетных мышц ондатры // *Молекул. генетика и биофизика.* 1989. № 14. С. 15–17.
9. *Мальшев И.Ю., Манухина Е.Б.* Стресс, адаптация и оксид азота // *Биохимия.* 1998. Т. 63, № 7. С. 992–1006
10. *Мальшев И.Ю., Меерсон Ф.З., Замотринский А.В., Буданова О.П.* Динамика становления и обратного развития феномена адаптационной стабилизации структур коррелирует с изменением содержания HSP 70 в миокарде // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 1993. Т. 116. № 8. С. 134–139.
11. *Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж.* Молекулярное клонирование. М., 1994. С. 348–350.
12. *Стародуб Н.Ф., Коробов В.Н., Назаренко В.И.* Миоглобин: структура, свойства, синтез, биологическая роль. К., 1992.

13. Aviv H., Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. Vol. 69. N6. P. 1408–1420.
14. Blanchetot A., Wilson V., Wood D., Jeffrey A. The seal myoglobin gene an unusually long globin gene // Nature. 1983. Vol. 301. N5902. P. 732–734.
15. Marber M.S., Mestral R., Chi S.-Y., Sayen M., Yellon D.M., Dillmann W. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury // J. Clin. Invest. 1995. Vol. 95. P. 1446–1456

#### **EFFECT OF HYPOXIC HYPOXIA OF DYNAMIC MYOGLOBIN EXPRESSION OF INTACT RATS**

**V. Korobov, O. Korobova**

*Ivan Franko National University of L'viv,  
Hrushevskoho st. 4, L'viv 79005, Ukraine,  
e-mail: [biolog@franko.lviv.ua](mailto:biolog@franko.lviv.ua)*

Hypoxical hypoxia effect on myoglobin biosynthesis in skeletal rat muscles. By the method of competitive molecular hybridization it was shown that hypoxical stress caused the temporary mRNA degradation. The adaptation of animals to low O<sub>2</sub> level lead to activated expression of Mb gene and some new genes that were not expressed at normal O<sub>2</sub> level.

*Keywords:* myoglobin; hypoxic hypoxia; expression of myoglobin gene.

Стаття надійшла до редколегії 15.02.2001

Прийнята до друку 11.04.2001