

УДК 577.152.6

NO-ЕРГІЧНА ЛАНКА РЕГУЛЯЦІЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ДИХАННЯ У ЩУРІВ З РІЗНОЮ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ГІПОКСІЇ

Іккерт О. В., Кургалюк Н. М., Гордій С. К., Гальків М. О., Ткаченко Г. М.

За останні 10 років накопичилися дані, згідно яких оксид азоту розглядається як новий важливий фізіологічний регулятор функцій організму і метаболізму клітин. Той факт, що, у внутрішній мембрані МХ локалізована мітохондріальна NO-синтаза, яка продукує оксид азоту (NO) [1], призвів до перегляду поглядів стосовно механізмів регуляції клітинного дихання. NO який продукується мітохондріями (МХ), є важливим чинником, що впливає на процеси енергозабезпечення МХ і продукування ними вільнорадикальних форм (за фізіологічних умов МХ є джерелом O_2^- та H_2O_2) [2, 3]. Враховуючи роль NO як клітинного месенжера, трансміттера і регулятора, було запропоновано, що інгібування (модуляція) оксидом азоту мітохондріального дихання може виступати новим біохімічним шляхом регуляції споживання O_2 і енергії тканинами за умов динамічних навантажень, враховуючи всюдисутність МХ і здатність NO легко дифундувати через мембрани [1-4].

У каскаді клітинних метаболічних перетворень центральною ланкою регуляції цього процесу залишається аеробна компонента енергетичного обміну [5]. Особливості реакції організму на дефіцит кисню проявляються не тільки на організмовому, а й на органному і тканинному рівнях. Зокрема, різна резистентність до дії гіпоксії корелює з особливостями функцій енергозабезпечення [5, 6]. Встановлено, що для низькорезистентних до гіпоксії особин характерна менша ефективність роботи енергетичного апарату мозку і серця у нормі, більша ушкоджувальність ферментів дихального ланцюга при гіпоксії, що пов'язується з кінетичними властивостями НАДН-цитохром с оксидоредуктази і цитохромоксидази [5, 6].

Враховуючи ці факти, ми поставили за мету дослідити вплив внутрішньоочеревинного введення попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту N^{\ominus} -нітро-L-аргініну (L-NNA) на стан енергозабезпечення, системи антиоксидантного захисту та процесів перекисного окиснення ліпідів у печінці щурів з різною резистентністю до гіпоксії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на 48 щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220 г, які утримувалися на стандартній дієті. Тварин попередньо розділяли за їх резистентністю до гіпобаричної гіпоксії на низько-(НР) і високорезистентних ВР за методом [7].

ВР і НР тваринам вводили внутрішньоочеревинно у кількості 1 мл: фізіологічний розчин, L-аргінін (600 мг/кг, фірми "Sigma", США) – та блокатор

синтази оксиду азоту N^o-монометил L-аргінін L-NNA (35 мг/кг, фірми «Sigma», США). Час дії кожного препарату склав 30 хв. Дихання та окисне фосфорилування (ОФ) досліджували полярографічним методом [8], активність каталази (КАТ) методом [9], супероксидисмутази (СОД) [10], глутатіонредуктази (ГР) [11] та глутатіонпероксидази (ГП) [12], концентрацію дієнових кон'югатів [13] і малонового діальдегіду [14, 15].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Тварини з різною резистентністю до гіпоксії характеризуються відмінностями у роботі дихального ланцюга МХ і використанням субстратів окиснення. У НР ведучим виступає окиснення сукцинату (СКЦ), а у ВР- α -кетоглутарату (КГ), що забезпечує останнім меншу напруженість енергозабезпечення та більшу економічність процесів окисного фосфорилування у них [5, 6]. Це підтверджується вищими значеннями показника спряженості процесів дихання та фосфорилування і ефективності фосфорилування у ВР тварин.

Як показали наші дослідження, введення L-аргініну призводить до зниження ефективності фосфорилування на 20% у НР та на 24% у ВР тварин при окисненні СКЦ, проте показник спряження процесів дихання та ОФ не змінювався в обидвох групах тварин [16]. Таке зниження дихання обумовлене зворотною взаємодією NO з МХ в ділянці комплексу IV, а саме з цитохромоксидазою с [4, 5, 17]. Ведення L-NNA при окисненні сукцинату утримувало АДФ-стимульоване дихання на рівні інтактних тварин, підвищувало процес спряження дихання та ОФ на 27% ($p < 0,05$), а ефективність фосфорилування на 20%. Ці зміни стосувались енергозабезпечення НР тварин, у ВР тварин ефективність фосфорилування (показник АДФ/О) знижувалась порівняно з інтактними тваринами на 24%. Окиснення КГ за умов введення L-аргініну не зазнавало істотних змін у НР щурів, а у ВР призводило до підвищення спряження дихання та окисного фосфорилування, проте ефективність фосфорилування знижувалась. Введення блокатора знижувало ефективності фосфорилування в обох групах тварин.

Нівелювання ефектів L-аргініну за умов введення блокатора NO-синтази підтверджує, що інгібування дихання може бути фізіологічним і патологічним. Пригнічення дихання за рахунок впливу на цитохромоксидазу є фізіологічним, не викликає незворотніх ушкоджень і дозволяє регулювати рівень енергетичного забезпечення клітини.

Добре відомо, що мішенню, через яку NO впливає на регуляцію клітинних функцій, виступає розчинна гуанілатциклаза: зв'язування NO з цим ферментом запускає серію ферментативних перетворень, що ініціюються цГМФ [18]. Інгібування дихання оксидом азоту привело до висновку про наявність додаткових мішеней в МХ, які ініціюють перетворення подібні до активації ГЦ [2]. Межі, в яких NO здійснює фізіологічну регуляцію, є широкими, і досить часто межують з цитотоксичними. Різні компоненти дихального ланцюга, а саме: комплекс I, залізо-сірчані кластери, цитохромоксидаза с були ідентифіковані як мішені для дії NO, і також різні механізми впливу NO (від конкуруючого і не конкуруючого зв'язування, до незворотніх пошкоджень) пропонуються для пояснення механізму дії NO.

Дослідження проведені С. Guivili і співр. запропонували наступний механізм впливу: NO, що утворюється в МХ модулює їх дихання та синтез АТФ за рахунок інгібування цитохромоксидази. В результаті взаємодії NO з цитохромоксидазою утворюються іони NO_2^- та NO_3^- . Механізм їх утворення є невідомим, проронуються наступні схеми: утворення NO_2^- під час окислення цитохромоксидази оксидом азоту, та/або утворення NO_3^- з NO у реакціях аналогічних до взаємодії NO з оксиміоглобіном та оксигемоглобіном ($[\text{Fe}^{\text{II}}\text{OONOCu}^{\text{I}}] \rightarrow [\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{I}}] + \text{NO}_3^-$ [1-3]).

У більшості випадків пошкоджуюча дія NO є непрямую і опосередкована рядом чинників. За фізіологічних умов МХ є джерелом O_2^- та H_2O_2 . NO здатний взаємодіяти із супероксидом з утворенням пероксинітриду [$\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$], і тому конкурує з СОД у процесі перехоплювання вільних радикалів. Крім того оксид азоту пригнічує активність каталази, що призводить до зростання вмісту H_2O_2 . Дослідження системи АОЗ і процесів ПОЛ у тварин, які відрізняються за чутливістю до дії гіпоксії, показало у контролі неоднакову активність ферментів і метаболітів, що засвідчує різну здатність до інактивації АФК за дії стресорних навантажень, які супроводжуються гіпоксійними процесами. Це характеризує резервні компенсаційні можливості організму при дії несприятливих факторів довкілля, які краще виражені у ВР шурів. Внутрішньоочеревинне введення L-аргініну для обох груп тварин супроводжується зниженням активності СОД, однак відсоток зниження був неоднаковим: для ВР тварин він становив 76,28% ($p < 0,05$), а НР – 90% порівняно з контролем. Вплив L-NNA за аналогічних умов призводив до протилежного ефекту в активності СОД – вона зростала на 11,4 та 16,7 % відповідно. Дія L-аргініну викликає зниження активності другого ферментау АОЗ – КАТ, яка у НР організмів за умов введення L-NNA зростала на 11,5% щодо значень інтактних шурів. На фоні пригнічення активності КАТ і СОД, значно зростала активність глутатіонової системи АОЗ, яка включає ГР та ГП. Проте наші дослідження засвідчили неоднакову її чутливість до NO-ергічної ланки регуляції. Введення L-аргініну призводило до зростання активності ГП і ГР у ВР, а введення блокатора – до зростання ГП та ГР у НР. На нашу думку, активація саме глутатіонової ланки АОЗ обумовлювала значне зниження продукції АФК, що підтверджувалось ефективним обмеженням процесів ПОЛ, які ми оцінювали за нагромадженням ДК і МДА.

ВИСНОВКИ

Підвищення показників АДФ-стимульованого дихання з одночасним зниженням спряженості й ефективності процесів фосфорилування під впливом екзогенного L-аргініну свідчить про зменшення ролі аеробного енергозабезпечення у процесах фізіологічної адаптації за умов дії стресорних навантажень, обумовлених гіпоксійним чинником, а ефективне обмеження продукції АФК робить її стійкою і тривалою.

Список літератури

1. Giulivi C., Poderoso A., Boveris A. Production of nitric oxide in mitochondria // J. of Biol. Chem. – 1998. – V. 273. №18. – P. 11038-11043.

2. Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism // *Biochem. J.* – 1998. – V.332. – P. 673-679.
3. Giulivi C., Boveris A., Cadenas E. The steady state concentration of oxygen radicals in mitochondria // *Reactive Oxygen Species in Biological System.* – New York, 1999. – P. 77-101
4. Borutaite V., Brown G. C. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide // *Biochem. J.* – 1996. – V. 315. – P. 295-299.
5. Лукьянова Л. Д. Биопергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // *Бюлл. экспериментальной биологии и медицины.* – 1997. – Т.124, №9. – С. 244-254.
6. Лукьянова Л. Д. Современные проблемы гипоксии // *Вестник РАМН.* – 2000. – №2. – С. 3-11.
7. Березовський В. А. Риси індивідуальності в реакції на гіпоксію // *Фізіол. журн.* – 1975. – Т.21, №3. – С. 371-376.
8. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М.: Наука, 1973. – 221 с.
9. Королук М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело.* – 1988. – 1. – С. 16-19.
10. Костюк В. А., Потанович А. И., Ковалева Ж. И. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – 2. – С. 88-91.
11. Путилина Ф. Е. Определение активности глутатионредуктазы // *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* Л.: Изд-во Ленингр. ун-та. – 1982. – С.181-183.
12. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // *Лаб. дело.* – 1986. – №12. – С.724-727.
13. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина. – 1977. – С.63-64.
14. Тимирбулатов Т. А., Селезнев С. И. Метод определения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // *Лаб. дело.* – 1988. – №4. – С.209-211.
15. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. П., Мажуль Л. М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – Т 33, N1. – С.118-122.
16. Іккерт О. В., Кургалюк Н. М., Гордій С. К., Гальків М. О. Вплив L-аргініну та N^o-нітро- L-аргініну на функціональний стан ізольованих мітохондрій печінки щурів з різною резистентністю до гіпоксії // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2000. – Вип. 5-6. – С. 17-20.
17. Torres J., Darley-Usmart V., Wilson M. Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implication for control of respiration // *Biochem. J.* – 1995. – V 312. – P. 169-173.
18. Кургалюк Н. М. Оксид азоту як функціональний регулятор фізіологічних процесів // *Наукові записки. Сер. біологія.* – 2000. – 2(9). – С. 97-102.