

Фізіологія людини і тварин

УДК. 577.391:577.171.55

ВПЛИВ L-АРГІНІНУ ТА N⁰-НІТРО – L-АРГІНІНУ НА СТАН ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ІЗ РІЗНОЮ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ГІПОКСІЇ В РАЗІ ДІЇ СТРЕСОВИХ НАВАНТАЖЕНЬ

О. Іккерт, Н. Кургалюк, С. Гордій

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

Досліджено вплив парентерального введення L-аргініну (600 мг/кг) і блока-тора NO-синтази N⁰-нітро – L-аргініну (35 мг/кг) на процеси енергозабезпечення в мітохондріях печінки щурів із різною резистентністю до гіпоксії за умов стресу. З'ясовано, що головні показники мітохондріального енергозабезпечення в контролі є вищими у високорезистентних тварин. Стрес призводить до підвищення АДФ-стимульованого дихання в низькорезистентних тварин за умов переважного окиснення сукцинату та зниження використання НАД-залежних субстратів, що свідчить про значну напруженість їхньої системи енергозабезпечення. Введення L-аргініну знижує аеробну компоненту енергозабезпечення у низькорезистентних тварин за умов окиснення сукцинату й α -кетоглутарату; L-NNA стимулює процеси енергозабезпечення у високорезистентних тварин за умов окиснення α -кетоглутарату.

Ключові слова: L-аргінін, N⁰-нітро–L-аргінін, мітохондріальне енергозабезпечення, гіпоксія, стрес.

Нестача кисню, або гіпоксія, є станом організму, який трапляється досить часто. Екстремальні навантаження, які супроводжуються патологічними змінами, прямо або опосередковано пов'язані зі змінами кисневого забезпечення організму. Гіпоксія та спричинені нею метаболічні порушення є провідними патогенетичними факторами за умов екстремальних станів різноманітного генезу [5, 6]. У каскаді метаболічних перетворень, які відбуваються у клітині під час гіпоксії, центральною ланкою, яка приймає участь у регулюванні процесу в цілому, є аеробний енергетичний обмін. З огляду на це, в захисті організму від

нестачі кисню першочерговою є проблема корекції функцій мітохондрій (МХ) та упередження розвитку біоенергетичної гіпоксії [2]. Оскільки патології супроводжуються ознаками біоенергетичної гіпоксії, то значення такого захисту важко переоцінити. Останніми роками з'ясовано важливу роль оксиду азоту в розвитку гіпоксичних явищ у клітині [8]. Виявлено, що оксид азоту є новим важливим фізіологічним регулятором функцій організму й метаболізму клітин, із яким пов'язане уявлення про нову стрес-лімітувальну систему [3, 9]. Дія цієї NO-ергічної системи ґрунтується на здатності активувати головні ланки стрес-реакції та підвищувати активність ендогенних захисних систем організму. Доведено, що фізіологічна активація цієї ланки регулювання у разі введення донорів груп оксиду азоту в багатьох випадках забезпечує ефективний захист від стресорних ушкоджень і підвищує адаптаційні можливості організму [8, 9]. Однак здатність високо- (ВР) і низькорезистентних (НР) до гіпоксії тварин реагувати на аналогічні стресорні ушкодження неоднозначна й недостатньо висвітлена в літературі.

Тому метою нашого дослідження було з'ясувати значення попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну та блокатора NO-синтази N^o-нітро – L-аргініну (L-NNA) в регулюванні системи енергозабезпечення МХ печінки щурів із різною резистентністю до гіпоксії у разі дії стресорних навантажень.

Дослідження виконано на 48 щурах-самцях лінії Вістар масою 200–220 г. Тварин попередньо розділяли за їхньою резистентністю до гіпобаричної гіпоксії на НР і ВР за методом [1]. Як метод стресування піддослідних тварин використали наведений у літературі [2] екстремальний вплив, пов'язаний з вільним плаванням щурів у клітці, закритій сіткою, відстань від води до сітки у якій становила 5 см. Температура води 22 °С. Час плавання – 30 хв. ВР і НР тваринам перед дослідом вводили внутрішньочеревно кількість 1 мл: фізіологічний розчин, L-аргінін (600 мг/кг, фірми „Sigma”, США) та блокатор синтази оксиду азоту L-NNA (35 мг/кг, фірми “Sigma”, США). Час дії кожного препарату становив 30 хв. Тварин декапітували одразу після плавання.

Мітохондрії печінки виділяли за загальноприйнятими методами модифікацій, що дають змогу зберігати нативність ізольованих МХ [4]. Функціональний стан МХ досліджували полярографічно за методом Чанса та Вільямса [8]. На підставі полярограм розраховували: швидкості поглинання кисню в основних метаболічних станах за Чансом (V3 та V4), показники дихального контролю за Чансом (CD (V3/V4)), ефективність фосфорилювання (АДФ/О) та швидкість фосфорилювання доданої АДФ (V_ф). Концентрацію білка вимірювали за Лоурі [13]. Результати досліджень опрацьовували статистично, використовуючи критерій Ст'юдента.

Відомо, що в тварин із різною резистентністю до гіпоксії ця особливість зберігається на органному й клітинному рівнях, і пов'язано це з початковими неоднаковими метаболічними особливостями, передусім з особливостями окисного метаболізму, який визначає регуляцію анаеробно-аеробних процесів і підтримання енергетичного гомеостазу [5].

Дані, наведені в табл. 1, засвідчують, що в контролі у НР тварин швидкість поглинання кисню (стан 3 за Чансом) – вища, ніж у ВР тварин, однак спряженість процесів дихання, ОФ і ефективність фосфорилювання була вищою у ВР. Це відображає більшу напруженість енергозабезпечення і меншу економічність процесів окисного фосфорилювання у НР тварин.

Таблиця 1

Вплив блокатора NO-синтази L-NNA та донора NO L-аргініну на показники дихання та окисного фосфорилювання МХ печінки щурів із різною резистентністю до гіпоксії за умов стресу при окисненні сукцинату (0,35 ммоль).

Умови досліджу	V3 нг-ат О за 1 хв на 1 мг білка	CD, V3/V4	АДФ/О, мкмоль АДФ на нг-ат білка	Vф, мкмоль АДФ за 1 хв на мг білка
Низькорезистентні				
Контроль	52,61±2,87	3,04±0,22	1,01±0,006	64,61±3,87
Стрес	73,46±6,87*	6,04±0,21*	1,02±0,11	121,5±13,45*
L-arg	34,69±0,09**	2,79±0,06	2,07±0,04**	73,92±10,2
L-NNA	74,99±,85**	4,69±0,54**	1,06±0,07**	77,91±7,92
Високорезистентні				
Контроль	37,27±1,33	3,34±0,11	1,90±0,05	58,09±2,97
Стрес	41,81±2,97	4,26±0,08*	1,36±0,30	59,05±9,04
L-arg	69,13±,12**	7,86±0,74**	1,34±0,14	85,27±2,86
L-NNA	67,90±,10**	4,11±0,42	1,43±0,06	75,95±5,95

* Достовірні зміни між контролем і стресом ($p < 0,05$);

** Достовірні зміни між стресом і введенням L-аргініну та L-NNA.

Тварини з низькою резистентністю до дії гіпоксичного чинника є чутливіші і до інших стресових навантажень, зокрема, за умов стресу в разі окиснення сукцинату в них зростала швидкість поглинання кисню у стані 3 за Чансом на 39% ($p < 0,05$) з одночасним зростанням швидкості фосфорилювання на 89% ($p < 0,05$) (див. табл. 1), і підвищувалась спряженість процесів дихання та окисного фосфорилювання (ОФ) майже вдвічі, хоча ефективність фосфорилювання не змінювалась. За цих умов у ВР тварин не фіксували змін процесів енергетичного забезпечення. Введення L-аргініну НР тваринам призводить до зниження показників енергетичного забезпечення, проте ефективність фосфорилювання зростає на 96% ($p < 0,05$), блокатор NO-синтази L-NNA повертає показники дихання й ОФ до рівня стресованих тварин. У ВР до дії гіпоксичного чинника тварин введення як блокатора, так і L-аргініну призводить лише до зростання швидкості поглинання кисню МХ печінки щурів в стані 3 за Чансом на 63%, і також L-аргінін підвищує спряженість процесів дихання та ОФ, не впливаючи на

ефективність фосфорилювання. Це може свідчити про те, що вихідний рівень NO-ергічної ланки регуляції у ВР тварин є вищим і не потребує додаткового надходження попередників, або донорів NO.

Використання НАД-залежного субстрату окиснення α -кетоглутарату довело, що використаний нами метод стресування призводить до зростання швидкості поглинання кисню в стані 3 за Чансом МХ печінки НР тварин на 43 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем, та підвищення спряженості процесів дихання та ОФ на 20%. За умов окиснення сукцинату ефективність фосфорилювання (показник АДФ/О) не змінювалася порівняно з контролем, у разі ж використання α -кетоглутарату як субстрату окиснення цей показник знижувався на 22 % ($p < 0,05$) (див. табл. 2). У ВР організмів за цих умов також знижувалась ефективність фосфорилювання, хоча решта показників енергозабезпечення були незмінні.

Таблиця 2

Вплив блокатора NO-синтази L-NNA та донора NO L- аргініну на показники дихання й окисного фосфорилювання МХ печінки шурів з різною резистентністю до гіпоксії за умов дії стресових навантажень у разі окиснення α -кетоглутарату (1 ммоль)

Умови досліджу	V3, нг-ат О за 1 хв на 1 мг білка	CD, V3/V4	АДФ/О, мкмоль АДФ на нг-ат білка	Vф мкмоль АДФ за 1 хв на 1 мг білка
Низькорезистентні				
Контроль	30,18±1,68	3,81±0,07	1,71±0,03	48,95±4,58
Стрес	43,53±4,60*	4,61±0,31*	1,33±0,12*	55,40±7,70
L-arg	24,93±1,14**	3,0±0,06**	0,96±0,04**	23,96±1,48*
L-NNA	33,04±2,62	2,44±0,08*	0,99±0,11	31,50± 1,24*
Високорезистентні				
Контроль	46,4±1,55	6,17±0,84	1,78±0,07	52,97±9,79
Стрес	4196±2,91	4,49±0,22	1,42±0,04*	54,16±6,43
L-arg	39,35±2,12	3,70±0,21**	2,15±0,08**	84,71±9,44*
L-NNA	71,32±2,93**	5,14±0,34	1,14±0,02**	80,74±6,23*

* Достовірні зміни між контролем і стресом ($p < 0,05$);

** Достовірні зміни між стресом і введенням L-аргініну та L-NNA.

Попередник біосинтезу NO L-аргінін спричинив достовірне зниження всіх показників енергозабезпечення у НР тварин: швидкість АДФ-стимульованого дихання знижувалась на 44 % порівняно зі стресованими тваринами ($p < 0,05$), стимуляція дихання і спряженість процесів дихання та ОФ знижувалась на 27 і 34% порівняно зі стресом ($p < 0,05$) (див. табл. 2), на тлі значного зниження швидкості фосфорилювання і зростання його часу.

Таблиця 3

Вплив блокатора NO-синтази L-NNA та донора NO L- аргініну на показники дихання й окисного фосфорилювання МХ печінки шурів із різною резистентністю до гіпоксії за умов дії стресових навантажень у разі окиснення суміші α -кетоглутарату та малонату

Умови досліджу	V3, нг-ат О за 1 хв на 1 мг білка	CD, V3/V4	АДФ/О, мкмоль АДФ на нг-ат білка	Vф, мкмоль АДФ за 1 хв на 1 мг білка
Низькорезистентні				
Контроль	41,82±4,22	3,12±0,21	1,36±0,01	57,31±1,34
Стрес	44,71±4,67	4,07±0,57	1,31±0,04	46,80±1,02
L-arg	76,29±11,79**	3,75±0,81	1,63±0,12	119,28±19,39*
L-NNA	32,47±2,19**	3,34±0,34	1,33±0,01	35,08±3,11
Високорезистентні				
Контроль	23,95±1,15	2,96±0,11	1,73±0,04	41,26±5,13
Стрес	70,61±6,22*	4,33±0,49*	2,08±0,01*	147,1±16,31*
L-arg	32,47±2,19**	3,34±1,34	2,08±0,09	147,1±14,11
L-NNA	50,9±4,47**	4,85±0,15	0,89±0,06**	44,8±3,82**

* Достовірні зміни між контролем і стресом ($p < 0,05$);

** Достовірні зміни між стресом і введенням L-аргініну та L-NNA.

Таке зниження дихання можна пояснити тим, що NO зворотно взаємодіє з МХ в ділянці комплексу IV, а саме – з цитохромоксидазою шляхом часткового пригнічення дихання. С. Giulivi (1999) довів, що оксид азоту, який синтезується у МХ, може відігравати роль первинного регулятора рівня мітохондріального дихання через вищу константу K_M для NO порівняно з киснем і модулювати показники дихання та рівень синтезу АТФ [12]. Ефекти зниження дихання МХ зумовлені здатністю NO зв'язуватися з гемом заліза цитохрому c_3 , цитохромом с оксидази та участю в ефектах постійного впливу на два інші комплекси дихального ланцюга МХ [11,12]. Зокрема, цитотоксичні концентрації NO здатні незворотно взаємодіяти із залізо-сірковмісними центрами комплексів I (NADH-CoQ редуктази) і II (сукцинат CoQ редуктази) та знижувати процеси окиснення у МХ [16]. Використання блокатора NO-синтази також не приводить до поліпшення енергозабезпечення у НР тварин, хоча швидкість АДФ-стимульованого дихання й повертається до контрольного рівня, однак спряженість процесів дихання та ОФ і ефективність фосфорилювання є значно нижчі. Ці дані підтверджують той факт, що саме сукцинатоксидазний шлях забезпечує НР тваринам підтримання необхідного рівня енергізації, і ефекти NO-ергічної ланки регуляції виявляються через регулювання його окиснення. Введення L-аргініну ВР зумовлює зниження спряженості процесів дихання та ОФ і утримує швидкість АДФ-стимульованого

дихання на рівні значень у тварин підданих стресу. Ефективність фосфорилювання підвищується на 31 % відбувається завдяки зростанню швидкості фосфорилювання і зниженню його часу (див. табл. 2). Дія блокатора має стимулюючий вплив на процеси енергозабезпечення, однак ефективність фосфорилювання в цьому разі знижується.

Отже, у ВР регульовальний вплив NO-ергічної ланки регуляції виявляється під час окиснення α -кетоглутарату і має стимульовальні ефекти для L-аргініну й інгібітора його синтази. Проте реалізація ефектів відбувається різними шляхами: L-аргінін забезпечує зростання ефективності фосфорилювання, а введення блокатора NO-синтази призводить до зростання швидкостей поглинання кисню і спряженості дихання та ОФ.

Відомо, що в разі окиснення доданого КГ, особливо стимульованого АДФ, певний внесок у споживання кисню робить окиснення в МХ ендogenous, а також генерованого з КГ сукцинату. Тому для виявлення „чистого” внеску в окиснення КГ у комірку поміщали інгібітор сукцинатдегідрогенази – малонат [4]. Як видно з табл. 3, внесок малонатчутливого дихання в окиснення екзогенного КГ був значно вищий у НР щурів порівняно з ВР, що відображає вищу активність сукцинатоксидазного шляху для цієї групи особин. За умов стресу посилюється значення малонатчутливої компоненти дихання у ВР, що опосередковується важливішою роллю НАД-залежних субстратів окиснення.

Уведення L-аргініну за цих умов призводило до зростання швидкості поглинання кисню в стані 3 за Чансом на 81 % у НР тварин і зменшення часу фосфорилювання на 36 % ($p < 0,05$), (див. табл. 3). У ВР тварин за цих умов знижувалась лише швидкість АДФ-стимульованого дихання, інші показники енергозабезпечення не зазнавали вірогідних змін. Інгібіторний аналіз засвідчив, що введення L-NNA не призводило до статистично достовірних змін показників енергозабезпечення у НР тварин. У ВР знижувалась ефективність фосфорилювання на 57 % ($p < 0,05$), (див. табл. 3), унаслідок зниження швидкості фосфорилювання та зростання його часу.

Отримані нами дані важливі для визначення шляхів корекції мітохондріального енергозабезпечення тварин із низькою резистентністю до гіпоксії за умов різного функціонування NO-ергічної ланки регуляції. Такими підходами могли б бути фармакологічне використання L-аргініну як попередника біосинтезу оксиду азоту та інших біологічно активних речовин (донорів NO), дія яких спрямована на стабілізацію тканинного дихання за умов дії екстремальних чинників, які супроводжуються гіпоксійним чинником.

1. *Березовський В. А.* Риси індивідуальності в реакції на гіпоксію //Фізіол. журн. 1975. Т. 21. №3. С. 371–376.
2. *Бондаренко О. Н., Бондаренко О. А., Манухина Е. Б.* Влияние различных методик стрессирования и адаптации на поведенческие и соматические показатели у крыс //Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. 1999. Т. 126. №8. С. 157–160.
3. *Волин М. С., Дэвидсон К. А., Камински П. М. и др.* Механизмы передачи сигнала оксидант – оксид азота в сосудистой ткани //Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 7. С. 958–965.
4. *Кондрашова М. Н.* Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани //Биохимия. 1991. Т. 56. Вып. 3. С. 388–403.
5. *Лукьянова Л. Д.* Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции //Бюлл. эксперим. 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. *Мальшев И. Ю., Манухина Е. Б.* Стресс, адаптация и оксид азота //Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 7. С. 992–1006.
8. *Мальшев И. Ю., Монастырская Е. А., Смирин Б. В., Манухина Е. Б.* Гипоксия и оксид азота //Вестник РАМН. 2000. №9. С. 44–51.
9. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом /Под ред. *Г. М. Франка*. М.: Наука, 1973. 221с.
10. *Borutaite V., Brown G. C.* Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide //Biochem. J. 1996. Vol. 315. P. 295–299.
11. *Gross S., Wolin M.* Nitric oxide: pathophysiological mechanism //Annu Rev. Physiol. 1995. Vol. 57. P. 737–769.
12. *Giulivi C.* Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism //Biochem.J.1998. Vol. 332. P. 673–679.
13. *Giulivi C., Boveris A., Cadenas E.* The steady state concentration of oxygen radicals in mitochondria //Kluwer Academic /Plenum Publishers, New York, 1999. P. 77–101
14. *Ingwall J., Kelly R.* Nitric oxide, myocard oxygen consumption, and ATP synthesis// Circ. Res. 1998. Vol. 83. P. 1067–1068.
15. *Lizasoin I., Moro M. A., Moncada S.* Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose // Biochem. J. 1996. Vol. 314. P. 877–880.
16. *Lowery O. H., Rosebroughh N. I., Farr A. L., Randall R. I.* Protein measurement with the Folin phenol reagent //J.Biol.Chem. 1951. Vol. 193. N1. P. 265–275.

**THE INFLUENCE OF L-ARGININE AND N⁰-NITRO - L-
ARGININE ON ENERGY METABOLISM OF RATS LIVER
MITOCHONDRIA WITH DIFFERENT RESISTANCE TO
HYPOXIA UNDER STRESS CONDITION**

O. Ikkert, N. Kurhalyuk, S. Hordii

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

It was investigated the influence of L-arginine (600 mg/kg) and NO-synthase blocator N⁰-nitro-L-arginine L-NNA (35mg/kg) on processes of ADP-stimulated respiration of rats liver mitochondria with different resistance to hypoxia under stress conditions. It have been shown that energy metabolism indices are higher in HR animals in control group. Stress causes increasing of ADP-stimulated respiration in LR under succinate oxidation and decreasing of NADPH-dependent utilisation, indicative of more effort of energy system in LR animals. L-arginine injection decreases the aerobic link of energy metabolism in LR under oxidation as succinate as α -ketoglutarate. Treatment with L-NNA causes increasing the energy metabolism in HR under α -ketoglutarate oxidation.

Keywords: L-arginine, N⁰-nitro-L-arginine, energy metabolism, hypoxia, stress.

Стаття надійшла до редколегії 28.02.2001
Прийнята до друку 12.04.2001