

**Н.М. Кургалюк**

## **Стан мітохондріального дихання і кальцієвої ємності печінки щурів з різною резистентністю до гіпоксії за умов введення L-аргініну**

*В эксперименте на крысах с высокой и низкой резистентностью к гипоксии изучали процессы митохондриального дыхания, окислительного фосфорилирования и кальциевой емкости в ткани печени после внутрибрюшинного введения L-аргинина (600 мг/кг) и блокатора синтазы оксида азота L-NNA (35 мг/кг). Использовали следующие субстраты окисления: 0,35 ммоль/л сукцината, 1 ммоль/л  $\alpha$ -кетоглутарата, 1 ммоль/л  $\alpha$ -кетоглутарата и 2 ммоль/л малоната. Повышение АДФ-стимулируемого дыхания под влиянием экзогенного L-аргинина с одновременным снижением сопряжения и эффективности процессов дыхания (дыхательного контроля по Чансу и АДФ/О) при окислении указанных субстратов свидетельствует об уменьшении роли аэробного энергообеспечения и обратимости ингибирующего влияния оксида азота на исследуемые процессы. Это может использоваться как механизм регуляции клеточной активности одного из ведущих ферментов цикла Кребса – сукцинатдегидрогеназы. Установлена способность L-аргинина увеличивать кальциевую емкость митохондрий низкорезистентных к гипоксии крыс при использовании субстратов сукцината и альфа-кетоглутарата до контрольных значений у высокорезистентных животных. Эта способность нивелируется при парентеральном введении блокатора синтазы оксида азота L-NNA.*

### **Вступ**

Основним механізмом фазних змін різноманітних функцій клітини за умов дії екстремальних чинників докільля залишається модифікація стану аеробної ланки енергетичного обміну [1]. Зміни мітохондріальних ферментних комплексів за цих умов відображають різні стадії біоенергетичної гіпоксії, яка є провідною компонентою тканинної гіпоксії. Цей процес тісно спряжений зі змінами показників аденілатного пулу і перш за все внутрішньоклітинної концентрації АТФ [2, 4].

Відомо, що енергетичний обмін висвітлює як провідний фактор механізму формування метаболічних шляхів у тварин, які відрізняються за резистентністю до дії гіпоксичного фактора і значно залежить від переважання холінергічних (для щурів з високою резистентністю, ВР) і адренергічних (для низкорезистентних, НР) регуляторних впливів організму [3]. Встановлено, що для щурів з НР 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. Ці функціонально-метаболічні особливості доповнюються особливостями стану симпато-адреналової системи, вираженими ознаками метаболічного ацидозу, підвищеною проникністю мембран, меншою активністю антиоксидантних систем тощо [4, 5].

© Н.М. Кургалюк

З'ясування ролі оксиду азоту як активатора нової стреслімітуючої системи привернуло увагу до сполук, які за фізіологічних умов можуть виступати донорами цієї унікальної молекули при екстремальних навантаженнях організму, що супроводжуються гіпоксичними явищами [6]. У своїх дослідженнях ми намагалися встановити ефекти парентерального введення екзогенного L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA на стан енергозабезпечення і кальцієвої ємності мітохондрій печінки у щурів з високою і низькою резистентністю до гіпоксії. У цьому полягала мета нашого дослідження.

## Методика

Дослідження проведено на 36 щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220 г, які утримувалися на стандартній дієті. Тварин попередньо розділяли за їх резистентністю до гіпобаричної гіпоксії на НР і ВР згідно з методом В.Я.Березовського (1975). Величину реакції тварин на гостру гіпоксію оцінювали за часом їх перебування на "висоті" 12 000 м ("підйом" у барокамері) до появи другого агонального вдиху або судом. У ВР тварин він складав 7 хв і більше, у НР – до 2 хв.

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<sup>ω</sup>-нітро-L-аргінін L-NNA (35 мг/кг, фірми "Sigma", США). Час дії кожного препарату становив 30 хв. Тварин декапітували під ефірним наркозом.

Мітохондрії (МХ) печінки виділяли за схемою досліду, що дозволяє зберігати нативність ізольованих мітохондрій і наведена у роботі [8]. Видалений з декапітованих тварин орган зберігали протягом 10 хв в льодяному середовищі гомогенізації (-20°C). Охолоджену тканину подрібнювали, пропускаючи через прес, і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Евельгейма при швидкості обертів 300 хв<sup>-1</sup> і 3 вертикальних ходах товчачика. Середовище гомогенізації містило для печінки (в ммоль/л): KCl – 120, NEPES – 10, EGTA – 1, рН 7,2. З 8%-го гомогенату центрифугуванням поетапно осаджували фракцію ядер: 3 хв при 150 g і 4 хв при 300 g без зупинки центрифуги. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту протягом 10 хв при 4500 g. Отриманий непромитий осад регомогенізували з середовищем гомогенізації вручну (один вертикальний хід товчачика) з розрахунку отримання суспензії МХ печінки з концентрацією 70-90 мг мітохондріального білка в 1 мл. Функціональний стан мітохондрій досліджували полярографічно [7] за методом Чанса та Вільямса [18]. Концентрацію білка вимірювали за методом Лоурі [20].

Вихід Н<sup>+</sup> з МХ печінки реєстрували за допомогою РН-метричної установки, зібраної на базі водневого електрода ЭСЛ-43-07, універсального іонометра ЭВ-74, самописця КСП-4, магнітної мішалки для розмішування суспензії та скляної термостатованої відкритої комірочки об'ємом 2 мл. Середовище інкубації містило (ммоль/л): KCl – 120, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 2, NEPES – 10, рН 7,2. У середовище вносили 4-5 мг мітохондріального білка. Відповідно до умов інкубації додатково вносили сукцинат (0,35 ммоль/л), α-кетоглутарат (1 ммоль/л), малонат (2 ммоль/л) натрію. Розчини усіх речовин,

які додавали у комірку, попередньо доводили до рН середовища інкубації. Температура інкубації становила 26<sup>0</sup>С. Кількість іонів Н<sup>+</sup>, які виділялись з МХ, розраховували із урахуванням буферної ємності середовища інкубації за допомогою його титрування 0,01 моль/л НСІ. Ми застосовували фізіологічні добавки СаСІ<sub>2</sub> (по 100 нмоль/л) за умов відсутності у середовищі інкубації АТФ і Mg<sup>2+</sup>. У таких умовах немає масивного нагромадження кальцію у матриксі МХ, пошкодження їх мембрани та роз'єднання дихання і окиснювального фосфорилування. На основі рН-метричних записів розраховували кальцієву ємність МХ. При визначенні кальцієвої ємності МХ, тобто максимальної кількості кальцію, яку вони можуть поглинути, у суспензію цих органел послідовно вносили кілька невеликих добавок кальцію. При субмаксимальному навантаженні кальцієм у відповідь на внесення Са<sup>2+</sup> у середовище інкубації МХ спостерігалось його закиснення. Величину кальцієвої ємності реєстрували після настання швидкого виходу Са<sup>2+</sup> з МХ у середовище інкубації, яке супроводжується його залужненням. Показник кальцієвої ємності МХ визначали у нмоль/л Са<sup>2+</sup>/мг білка. В основу розрахунку виходу іонів Н<sup>+</sup> була покладена стехіометрія виходу Н<sup>+</sup> у середовище інкубації МХ при поглинанні ними Са<sup>2+</sup> - 1Н<sup>+</sup>/1 Са<sup>2+</sup> [16]. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій t Стьюдента.

### Результати та обговорення

Дослідження стану енергозабезпечення мітохондрій (МХ) печінки НР і ВР щурів при використанні як субстрату окиснення сукцинату засвідчило, що контрольні значення у цих групах тварин відрізняються (див. табл.1 і 2). Зокрема, це стосується значень АДФ-стимульованого дихання (стан V<sub>3</sub>), який був вищим у НР тварин на 30,74%, хоча спряженість процесів дихання і фосфорилування (показник дихального контролю за Чансом, ДК) та ефективність використання кисню (АДФ/О) залишався вищим у ВР особин. Аналогічні результати отримано у інтактних тварин при використанні інших досліджуваних нами субстратів окиснення. Таким чином, однакова ефективність роботи дихального ланцюга МХ печінки обох груп тварин досягалась за рахунок вищої напруженості енергозабезпечення у НР тварин, що свідчить про меншу економічність у них процесів окиснювального фосфорилування у цілому. Це зазначалось деякими авторами [4, 5] як ефект вичерпання резерву дихальної активності МХ у НР порівняно з ВР, і може свідчити про особливу ушкоджуваність саме НАД-залежного дихання за умов дії гіпоксичних чинників.

Встановлено, що при окисненні екзогенного α-кетоглутарату (КГЛ) у стані V<sub>3</sub> значний внесок був пулу ендогенної янтарної кислоти, яку виявляємо у інгібіторному аналізі з використанням малонату. Велика кількість ендогенного сукцинату, яка міститься в органелах або утворюється під час інкубації, здатна значно модифікувати фосфорилуюче дихання при окисненні НАД-залежних субстратів [1, 2]. Це пояснюється дуже великою швидкістю окиснення ендогенної янтарної кислоти порівняно з доданою у полярографічну комірку. Зокрема, для НР щурів внесок малонатчутливого дихання в окиснення екзогенного КГЛ був

**Таблиця 1. Зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання мітохондрій печінки щурів (нг атом О·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>білка) з низькою резистентністю до гіпоксії за умов парентерального введення L-аргініну (600 мг/кг) і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA (35 мг/кг) (M±m, n=6)**

Умови досліджу	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	Дихальний контроль	АДФ/О	V <sub>ф</sub>
Сукцинат, 0,35 ммоль/л					
Контроль	47,88±3,16	17,22±1,42	2,49±0,21	1,18±0,026	42,53±4,16
L-аргінін	52,75±4,22	22,93±2,81	2,38±0,34	0,94±0,001*	49,25±7,0
L-NNA	49,17±6,12	13,88±1,01	3,17±0,22	1,41±0,001*	65,28±8,24*
α-кетоглутарат, 1 ммоль/л					
Контроль	25,67±2,10	7,41±0,1	3,39±0,11	1,54±0,011	37,58±3,22
L-аргінін	37,59±1,14*	10,80±0,36*	3,50±0,24	1,52±0,001	48,77±2,16*
L-NNA	38,49±3,18*	11,71±0,34*	3,21±0,01	1,28±0,03*	47,15±3,33
α-кетоглутарат, 1 ммоль/л та малонат, 2 ммоль/л					
Контроль	41,82±4,22	14,24±1,34	3,12±0,21	1,36±0,01	57,31±1,34
L-аргінін	22,47±2,33*	7,97±0,96*	3,07±0,44	1,69±0,01*	33,33±6,13*
L-NNA	28,31±1,11*	9,70±0,86*	3,03±0,11	1,38±0,012	41,36±2,34*

Примітка: Тут і далі: \*- Вірогідність результатів щодо досліджу і контролю (P<0,05).

**Таблиця 2. Зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання мітохондрій печінки щурів (нг атом О·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>білка) з високою резистентністю до гіпоксії за умов парентерального введення L-аргініну (600 мг/кг) і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA (35 мг/кг) (M±m, n=6)**

Умови досліджу	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	Дихальний контроль	АДФ/О	V <sub>ф</sub>
Сукцинат, 0,35 ммоль/л					
Контроль	36,62±2,33	11,15±1,22	3,34±0,11	1,52±0,01	44,71±1,16
L-аргінін	50,46±1,18	14,25±2,16	4,03±0,25*	1,15±0,03*	56,43±5,22
L-NNA	45,89±4,11	14,26±3,84	3,69±0,19	1,18±0,01	54,58±4,18
α-кетоглутарат, 1 ммоль/л					
Контроль	39,12±1,24	6,38±0,44	3,96±0,44	1,61±0,081	46,46±3,14
L-аргінін	40,88±2,39	8,81±0,56*	4,58±0,18	1,44±0,084	55,89±5,16*
L-NNA	29,29±1,18*	11,66±0,98*	3,05±0,35	1,35±0,075	33,97±1,25*
α-кетоглутарат, 1 ммоль/л та малонат, 2 ммоль/л					
Контроль	23,95±1,15	8,31±0,77	2,96±0,11	1,73±0,04	41,26±5,13
L-аргінін	41,59±2,15*	11,82±0,35*	2,55±0,01*	1,17±0,01*	40,07±4,14
L-NNA	29,79±3,55	10,13±0,21	2,86±0,15	1,33±0,03*	42,21±1,13

значно вищий порівняно з ВР, що відображає вищу активність сукцинат-оксидазного шляху для цієї групи особин.

Парентеральне введення L-аргініну щурам з високою і низькою резистентністю до дії гіпоксичного чинника супроводжується підвищенням значень АДФ-стимульованого дихання та швидкості фосфорилування (V<sub>ф</sub>) при використанні як субстратів окиснення СК і КГЛ, проте у всіх випадках відношення АДФ/О залишається нижче рівня у інтактних щурів. Лише у

випадку окиснення КГЛ в обох групах підвищується показник спряжен-ня дихання і фосфорилування (ДК за Чансом). Вплив блокатора синтази оксиду азоту L-NNA за цих умов викликав вірогідне підвищення значення АДФ/О при окисненні СК, в той час як при окисненні КГЛ він вірогідно знижувався в обох групах щурів.

Малонатчутлива компонента окиснення КГЛ у ВР щурів при оцінці показника АДФ/О залишається вищою у інтактних щурів, проте вплив L-аргініну вірогідно його обмежував для ВР (на 32,5%,  $P < 0,05$ ) і підвищував для НР (на 24,26%,  $P < 0,05$ ). Ці зміни нівелювалися введенням блокатора синтази оксиду азоту. Тобто, вичленування ефектів ендogenous сукцинату за умов стимуляції NO-ергічної ланки при введенні донорів оксиду азоту у НР сприяє підвищенню ефективності використання кисню для синтезу макроергів у дихальному ланцюгу. Для ВР тварин отримані вищі значення спряження дихання (ДК) і ефективності фосфорилування (АДФ/О) за цих умов при обмеженні ефектів оксиду азоту і дії блокатора L-NNA.

Отже, проведені дослідження вказали на залежність ефектів дії попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну у реалізації механізмів постачання НАД- (КГЛ) і ФАД-залежних (СК) субстратів для дихального ланцюга МХ, що має регуляторну роль у процесах окиснювального фосфорилування і значно залежить від резистентності до гіпоксії.

Аналіз літературних даних засвідчує неоднозначність ефектів оксиду азоту на мітохондріальне дихання: при використанні субстратів окиснення СК і глутамату у МХ скелетних м'язів спостерігалось зворотне зниження споживання кисню при інкубації з донором оксиду азоту S-нітрозоглутатионом [19]; додавання донора груп оксиду азоту SNP і використанням радіоактивної мітки  $^{14}\text{C}$  засвідчило активацію окиснення субстратів пірувату, пальмітату і лейцину, окиснення глюкози за цих умов було найвищим [24]. Отримані ефекти пов'язуються авторами з роллю оксиду азоту як первинного регулятора рівня мітохондріального дихання через вищу константу  $K_m$  для NO порівняно з киснем. Ефекти зниження дихання МХ зумовлені здатністю NO зв'язуватися з гемом заліза цитохрому  $c_3$  цитохром-с-оксидази та участю в ефектах постійного впливу на два інших комплекси дихального ланцюга МХ. Зокрема, цитотоксичні концентрації NO здатні незворотно взаємодіяти з залізо-сірковмісними центрами комплексів I (NADH-CoQ редуктази) і II (сукцинат CoQ редуктази) і таким чином знижувати процеси окиснення в МХ [20]. Встановлено, що ці процеси у МХ під впливом донора NO 1 mM нітропрусида натрію зумовлені зниженням активності аконітази, але не цитратсинтази і альфа-кетоглутаратдегідрогенази. Основним моментом цих досліджень вважалось перемикання обміну з аеробної компоненти на гліколіз, який встановлений за 50% збільшенням продукції лактату [11, 12].

Зазначено можливість реалізації ефектів оксиду азоту на мітохондріальне дихання декількома шляхами. Серед них NO-залежне зниження інтенсивності окиснення викликане активацією холінергічних мускаринових  $M_2$  і брадикінінових  $BK_2$  у скелетних м'язах [22], роллю цГМФ-залежних реакцій в ефектах ендogenous NO [17], посиленням активації NOS у МХ різних типів клітин. Гістохімічними методами показано кореляційний зв'язок між eNOS і сукцинатдегідрогеназою МХ [22].

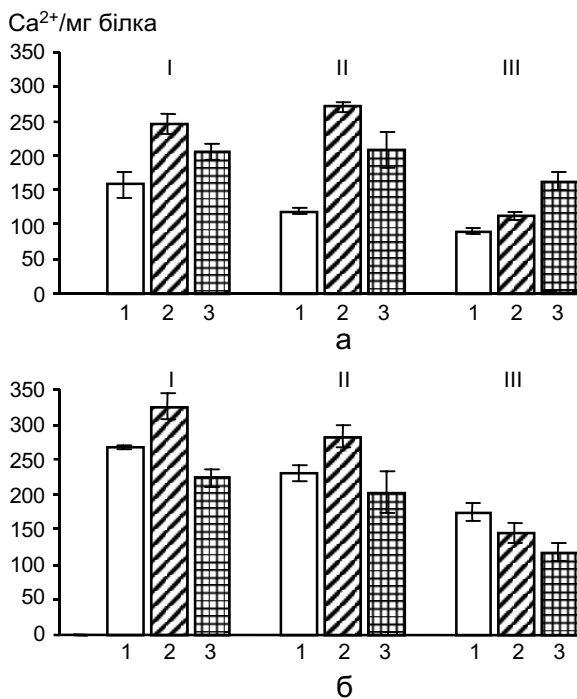
Таким чином, підвищення показників АДФ-стимульованого дихання при окисненні екзогенних субстратів за умов парентерального введення попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну з одночасним зниженням спряженості і ефективності процесів фосфорилування доданої АДФ, може свідчити про оборотність процесів інгібування оксидом азоту мітохондріального дихання. За цих умов зниження ролі аеробного енергозабезпечення може використовуватися клітиною як механізм регуляції активності одного з головних ферментів циклу Кребса – сукцинатдегідрогенази.

Поглинання  $Ca^{2+}$  МХ печінки за нормальних фізіологічних умов у щурів з різною резистентністю до гіпоксії засвідчило у контролі неоднакові значення стосовно використання субстратів енергетичного обміну, зокрема, інтермедіатів циклу трикарбонових кислот. Це засвідчує різну здатність МХ високо- і низькорезистентних до гіпоксії тварин щодо активації дихального ланцюга, який у кінцевому підсумку здатний підтримувати відновлення мембранного потенціалу, пов'язане з виходом назовні  $H^+$  [10, 15]. Отримані результати досліджень приведено на рисунку.

Зокрема, це стосується вихідних значень кальцієвого нагромадження МХ при використанні сукцинату і  $\alpha$ -кетоглутарату натрію, які є вищими у ВР тварин: на 67% у першому випадку, 69,6% у другому. Можливо, це дає вагомі переваги ВР організмам за умов дії стресорних навантажень і сприяє зменшенню негативних ефектів порушення кальцієвого гомеостазу, який лежить в основі патогенезу деяких захворювань.

Використання сукцинату (СК) для встановлення кальційакумулюючої здатності МХ печінки НР щурів під впливом попередника біосинтезу оксиду азоту було значно більшим (55,6%,  $P < 0,01$ ) стосовно аналогічних

показників у ВР тварин (21,6%,  $P < 0,05$ ). Ці значення нівелюються при введенні блокатора L-NNA у ВР, і не повертаються до вихідних значень у НР щурів.



Зміни кальцієвої ємності мітохондрій (нмоль  $Ca^{2+}$  / мг білка) печінки у щурів з низькою (а) - і високою резистентністю (б) до гіпоксії за умов парентерального введення фізіологічного розчину (1), L-аргініну (2) і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA (3) при окисненні сукцинату (I),  $\alpha$ -кетоглутарату (II) і  $\alpha$ -кетоглутарату з малонатом (III).

Отже, викликане СК підвищення кальцієвої ємності МХ засвідчує важливу роль цього субстрату у процесах енергозабезпечення НР організмів.

Вплив альфа-кетоглутарату на кальційакумулюючу здатність МХ у печінці НР щурів виявився на 125% ( $P < 0,01$ ) вищим стосовно контрольних значень і суттєво не зменшувався при внутрішньоочеревинному введенні L-NNA. Для ВР щурів вплив цього субстрату циклу трикарбонових кислот викликав незначне порівняно з НР тваринами нагромадження кальцію, проте був статистично вірогідним, оскільки досліджуваний ефект повністю знімався введенням блокатора синтази оксиду азоту. Можливо, така дія пояснюється високими вихідними значеннями кальційакумулюючої здатності МХ печінки ВР організмів і засвідчує важливу роль цього НАД-залежного субстрату окиснення дихального ланцюга. Відомо, що альфа-кетоглутаратдегідрогеназа є кальційзалежним ферментом, і викликає зміни енергозабезпечення цим субстратом за умов дії сильних стресорних впливів.

Встановлено, що в окиснення альфа-кетоглутарату (КГ) свій внесок робить певна кількість ендogenous сукцинату, яка може модифікувати ефекти екзогенного КГ [1]. Тому з метою з'ясування внеску у дихальний ланцюг ендogenous сукцинату разом з КГ додавався інгібітор сукцинатдегідрогенази малонат. Слід зазначити, що у обох випадках для НР і ВР щурів внесок ендogenous СК у процесах кальцієвої ємності МХ виявився однаковим – 33-34%. Проте, ймовірно, саме ці кількості ендogenous СК зумовлювали високу кальцієву ємність МХ печінки НР тварин, оскільки при введенні L-аргініну ефект вірогідно посилювався, однак відсоток збільшення залишався значно нижчим порівняно з впливом субстратів окиснення КГ і СК. Для цієї серії експерименту вплив L-NNA на кальцієву ємність МХ на відміну від дії L-аргініну посилювався. Виключення пулу ендogenous СК за цих умов супроводжувалося у ВР щурів зниженням кальцієвої ємності, яке не поверталось до норми при дії блокатора.

З оксидом азоту, що вивільнюється в організмі з амінокислоти L-аргініну, пов'язують регуляцію систем внутрішньоклітинної сигналізації [9, 13]. Одним з таких механізмів виступає активація синтезу оксиду азоту, збільшення внутрішньоклітинної цГМФ і активація через систему G-кіназ кальцієвих pomp ендоплазматичного ретикулума, регуляція звільнення катіонів кальцію з пулу, нечутливого до  $IP_3$ , але чутливого до дії самих іонів  $Ca^{2+}$  і ADP-рибозилтрансферази. З іншого боку, оксид азоту може впливати на проникливість кальцієвих каналів, що зумовлює його важливу роль у процесах внутрішньоклітинної передачі, який реалізує свій вплив через ланку цГМФ [9, 24].

Первинний механізм дії донорів оксиду азоту пов'язується з активацією розчинної форми гуанілатциклази, що викликає підвищення вмісту внутрішньоклітинної концентрації цГМФ – вторинного месенджера клітинної активності. Припускається, що ефекти оксиду азоту реалізуються з участю тіолів та гемопротеїнів, глутатіон-S-трансферази та ін. ферментів. Певна роль у цих процесах належить системі цитохрому P-450, яка бере участь у метаболізмі органічних нітратів і зумовлює накопичення NO [2]. Активація гуанілатциклази під дією NO пов'язана з сульфгідрильними групами, зменшенням впливу іонів кальцію внаслідок блоку надходження іонів через потенціало залежні канали мембрани. Це призводить до зменшення

мобілізації кальцію з внутрішньоклітинних депо (ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії), активації механізмів виведення кальцію з клітини, стимуляції захоплення іонів кальцію та його накопичення у внутрішньоклітинних депо [14, 16]. Але основним компонентом серед цих реакцій вважається блокада входу іонів кальцію до клітини через хемочутливі кальцієві канали і безпосередній вплив цГМФ на активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  - АТФазу.

Отже, проведені дослідження встановили існування метаболічних регуляторних механізмів реалізації ефектів парентерального введення L-аргініну на процеси енергозабезпечення і кальцієву ємність мітохондрій печінки високо- і низькорезистентних до гіпоксії тварин, які можуть здійснювати корекцію енергозабезпечення при використанні високоефективних субстратів дихання у профілактиці станів, які супроводжуються гіпоксичним чинником.

*Дослідження підтримані Західно-Українським біомедициним дослідницьким центром.*

**N.M.Kurhalyuk**

### **MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND CALCIUM CAPACITY IN LIVER RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA UNDER L-ARGININE INJECTION**

In experiments on rats with different resistance to hypoxia are investigated processes of mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation and calcium capacity in liver under precursor nitric oxide L-arginine (600 mg/kg) and blockator nitric oxide synthase L-NNA (35 mg/kg) injections. We are used next substrates of oxidation: 0,35 mM succinate, 1 mM alpha-ketoglutarate, 1 mM alpha-ketoglutarate and 2 mM malonic acid. Increasing of ADP-stimulation respiration states under exogenous L-arginine injection, decreasing efficacy of respiration processes (respiration control on Chance and ADP/O) under such substrates oxidation, testify to oxide energy support decreasing and reversing nitric oxide inhibit in such conditions. This will be used as mechanism cell regulation succinate dehydrogenase activity. It has shown that L-arginine injection increase calcium mitochondrial capacity low resistance to hypoxia rats using substrates of oxidation succinate and alpha-ketoglutarate to control meanings of high resistance rats. Effects of nitric oxide precursor influence on this processes limit NO-synthase inhibitor L-NNA.

*Ivan Franko Lviv National University*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Кондрашова М.Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия.- 1991.- **56**, Вып.3.- С.388-403.
2. Кондрашова М.Н. Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке как механизм адаптации к гипоксии. – В кн. : Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М., 1989.- С.51-70.
3. Кургальюк Н.М., Шостаковська І.В. Вплив альфа-кетоглутарату натрію на активність ферментів переамінування та сукцинатдегідрогенази у щурів з різною резистентністю до гіпоксії // Фізіол. журн.- 1999.- **45**, №6.- С.51-58.



4. Лукьянова Л.Д. Клеточные механизмы резистентности организма к гипоксии / Гипоксия: Механизмы, адаптация, коррекция. Материалы Всерос. Конф. (2-4 дек. 1997), Москва. // Бюл.эксперим. биол. и медицины. - 1997.- С.74-75.
5. Лукьянова Л.Д., Романова В.Е., Чернобаева Г.Н. Особенности окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс с различной чувствительностью к кислородной недостаточности // Бюл.эксперим. биол. и медицины. - 1991.- №7.- С.49-51.
6. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е. и др. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих.- М.: Наука, 1998.- 159с.
7. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом.- М.: Наука.- 1973.- 221с.
8. Темнов А.В., Сирота Т.В., Ставровская И.Г. и др. Влияние супероксида воздуха на структурную организацию и фосфорилирующее дыхание митохондрий // Биохимия.- 1997.- **62**.- Вып. 10.- С.1272-1279.
9. Abraham R.Z., Kobzik L., Moody M.R., Reid M.B. and Stamler J.S. Cyclic GMP is a second messenger by which nitric oxide inhibits diaphragm contraction // Comp. Biochem. Physiol. - 1998.-119A(1).-P. 177-183.
10. Akerman K. Effect of pH and Ca<sup>2+</sup> on the retention of Ca<sup>2+</sup> by rat liver mitochondria // Arc. Biochem. Biophys.- 1978.- V.**189**, N2.- P.256-262.
11. Andersson U., Leighton B., Young M.E. et al. Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1998.- **249**(2).- P. 512-516.
12. Balon T., Nadler J. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle // J. Appl. Physiol. - 1997.- **82**(1).-P. 359-363.
13. Baron G., Cooper C.E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase // FEBS Lett.- 1994.- **356**.- P. 295-298.
14. Bates T., Loesch A., Burnstock G. and Clark J.B. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1996.- **218**(1).-P. 40-44.
15. Beatrice M.C., Palmer J., Pfeiffer D. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential and the retention of Ca<sup>2+</sup> by mitochondria // J. Biol. Chem.- 1980.- V.**255**, N18.- P.8663-8671.
16. Brand M., Chen C., Lehninger A. Stoichiometry of H<sup>+</sup> ejection during respiration-dependent accumulation of Ca<sup>2+</sup> by rat liver mitochondria // J. Biol.Chem.- 1976.- V.**251**, N4.- P.968-974.
17. Brown G. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase // FEBS Lett.- 1995.- **369**.- P.136-139.
18. Chance B., Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol.- 1956.- V.**17**.- P.65-134.
19. Cleeter M., Cooper J., Darley-Usmar V et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases // FEBS Lett.- 1994.-**345**.- 1.- P.50-54.
20. Giuffre A., Sarti A., D'Itri E et al. On the mechanism of inhibition of cytochrome c oxidase by nitric oxide // J. Biol. Chem.- 1996.- **271**.- P.33404-33408.
21. Lowery O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J.Biol.Chem.- 1951.- V.**193**.- N1.- P.265-275.
22. Kobzik L., Stringer B., Balligand J.L. et al. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships // Biochem. Biophys. Res. Commun.- 1995.- **211**(2).-P. 375-381.
23. Nicholls D., Akerman K. Mitochondrial calcium transport // Biochim.Biophys. Acta - 1982.- V.**683**, N1.- P.57-88.
24. Young M., Leighton B. Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/cGMP -evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase // FEBS Lett.- 1998.-**424**.-1-2.- P.79-83.