

Н.М. Кургалюк, Т.В. Серебровська

Роль циклу трикарбонових кислот у процесах енергозабезпечення та антиоксидантного захисту клітин при гострій гіпоксії

В опытах на крысах линии Вистар исследовали состояние системы антиоксидантной защиты и интенсивность процессов перекисного окисления липидов в крови и ткани печени крыс в условиях острой гипоксии, введения сукцината и α -кетоглутарата натрия на фоне действия блокаторов холино- и адренорецепторов. Показано, что стимуляция экзогенным α -кетоглутаратом натрия продукции оксида азота, оцениваемая по содержанию нитрит-аниона, в значительной степени опосредуется холинорецепторами.

ВСТУП

Протекторний ефект інтермедіата циклу трикарбонових кислот (ЦТК) сукцинату (СК) пов'язується з посиленням компенсаторної ролі сукцинатоксидазного шляху окиснення при патологічних станах, які супроводжуються гіпоксичними процесами [8]. Однак застосування СК як антигіпоксичного препарату дає позитивний результат не у всіх випадках через погану клітинну проникливість останнього, хоч при гіпоксії вона може збільшуватися [7]. Нині активно досліджується можливість використання як антигіпоксантів при ішемії міокарда попередників СК у реакціях переамінування (α -кетоглутарату натрію (КГЛ), аланіну, пірувату), що можуть утворюватися за гіпоксичних умов та забезпечувати дихальний ланцюг ендогенним СК при обмеженні НАД-залежного окиснення [4]. З'ясовано декілька таких циклів, з якими функціонально пов'язаний цикл оксиду азоту (NO) [14]. Метаболізм NO розглядається як частина стратегії захисту енергетичного апарату клітини за екстремальних наванта-

жень [15, 17]. Це може запобігати розвитку порушень у ділянці електронотранспортного ланцюга мітохондрій (МХ).

Відомо, що регуляція багатьох киснезалежних процесів організму (мітохондріальне дихання, мікросомальне окиснення, інтенсивність процесів ліпопероксидації і стан систем елімінації активних форм кисню тощо) здійснюється через рецепторні структури парасимпатичної та симпатичної ланки вегетативної нервової системи.

Метою нашого дослідження було з'ясування можливої ролі холіно- і адренорецепторів та інтермедіатів циклу трикарбонових кислот СК і КГЛ в NO-залежних процесах ліпопероксидації у крові та тканині печінки білих щурів при гострій гіпоксії.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 36 щурах-самцях лінії Вістар масою 0,2 – 0,22 кг. Перед дослідженням тварин поділили на 6 груп по 6 тварин у кожній. До першої групи ввійшли інтактні щури, яким перед дослідом парентерально вводили 1 мл фізіо-

логічного розчину. Тваринам дослідних груп (II – VI) парентерально вводили розчин СК (50 мг/кг) або КГЛ (200 мг/кг). Час дії препаратів 30 хв. Тварин дослідних груп поміщали в обладнану камеру, яка вентильовалася газовою сумішшю з 7% кисню в азоті. З метою поглинання вуглекислого газу та водяних парів у камері використовували адсорбент. При цьому тваринам V групи за 30 хв до початку експерименту перентерально вводили блокатори M- і N-холінорецепторів (5 мг атропіну і 10 мг бензогексонію) та КГЛ, а тваринам VI групи – блокатори α - і β -адренорецепторів (фентоламін і обзидан – по 2 мг) і СК.

Інтенсивність обміну оксиду азоту оцінювали за концентрацією його стабільного метаболіту нітрит-аніона (NO_2^-) спектрофотометричним методом [16]. Досліджували активність супероксиддисмутази (СОД) [6], каталази [5], глутатіонредуктази [12], глутатіонпероксидази [10], малонового діальдегіду за вмістом ТБК-реактивних продуктів [1, 11] і церулоплазмину (ЦП) [3]. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гостра гіпоксія супроводжувалася зниженням продукції оксиду азоту, яку оцінювали за вмістом його стабільного метаболіту нітрит-аніона, на 34% ($P < 0,05$, рис.1). Різке зниження вмісту кисню у вдихуваному повітрі, що супроводжувалося вираженими ознаками тканинної гіпоксії, інгібувало активність NO-синтазних ферментативних систем вірогідним обмеженням продукції оксиду азоту у тканині печінки. Додавання СК вдвічі підвищувало вміст нітрит-аніона за умов гострої гіпоксії, а КГЛ потроював його концентрацію. Таким чином, екзогенний КГЛ має більший стимулювальний ефект порівняно з впливом СК на вміст нітрит-аніона у тканині печінки за умов гіпоксії (див.рис.1). Як показали наші попередні дослідження [13], використання КГЛ з метою корекції мітохондріального енергозабезпечення через вплив на систему оксиду азоту за умов гострої гіпоксії викликає зміни основних величин функціонування МХ, які, з одного боку, здатні модифікувати енерговитрати, а з іншого – продукцію актив-

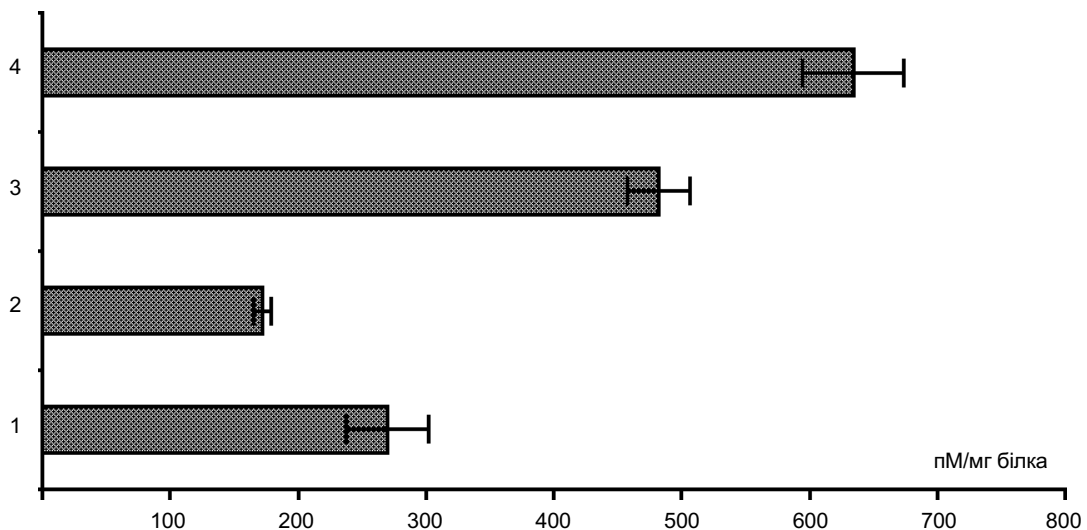


Рис.1. Зміни вмісту нітрит-аніона у тканині печінки щурів за умов гострої гіпоксії та введення сукцинату і α -кетоглутарату натрію: 1 – контроль, 2 – гостра гіпоксія, 3 – сукцинат і гостра гіпоксія, 4 – α -кетоглутарат натрію і гостра гіпоксія.

них форм кисню (АФК). Окиснення, спряжене з трансформацією енергії, значною мірою модифікується під впливом АФК, що утворюються внаслідок порушення процесів енергозабезпечення при гіпоксії [2]. У цьому дослідженні нами встановлено (рис. 2), що стимуляція вільнорадикального окиснення при гострій гіпоксії, оцінена за вмістом ТБК-реактивних продуктів у тканині печінки, змінюється при екзогенному введенні субстратів ЦТК (СК і КГЛ), при цьому вищий ефект обмеження інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) спостерігається при введенні КГЛ (зниження на 32%; $P < 0,001$) порівняно з введенням СК (зменшення лише на 25%; $P < 0,05$).

Однотимчасне введення щурам адреноблокаторів фентоламіну й обзидану та СК вірогідно знижувало вміст ТБК-реактивних продуктів у тканині печінки (на 21,5%, $P < 0,001$) порівняно з ефектами після введення лише СК при гострій гіпоксії. За умов введення блокаторів холіноре-

цепторів атропіну та бензогексонію разом з КГЛ нами отримано найвищі значення показників інтенсифікації процесів ПОЛ, які перевищували такі, котрі були тільки при введенні КГЛ (на 57%; $P < 0,001$). Таким чином, функціональний стан холінорецепторів опосередковує ефекти впливу КГЛ, а, відповідно, і продукованого під його впливом оксиду азоту.

Результати нашого дослідження свідчать, що гостра гіпоксія значно змінює активність основних антиоксидантних ферментів крові (таблиця). Спостерігається підвищення активності СОД, яке посилюється додаванням СК і ще більшою мірою – КГЛ. Адреноблокатори зменшують ці ефекти, а холіноблокатори взагалі усувають реакцію підвищення активності СОД при гострій гіпоксії.

Гіпоксія також викликала вірогідне зниження активності каталази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази. Додавання СК не змінювало активності каталази та глутатіонпероксидази, проте

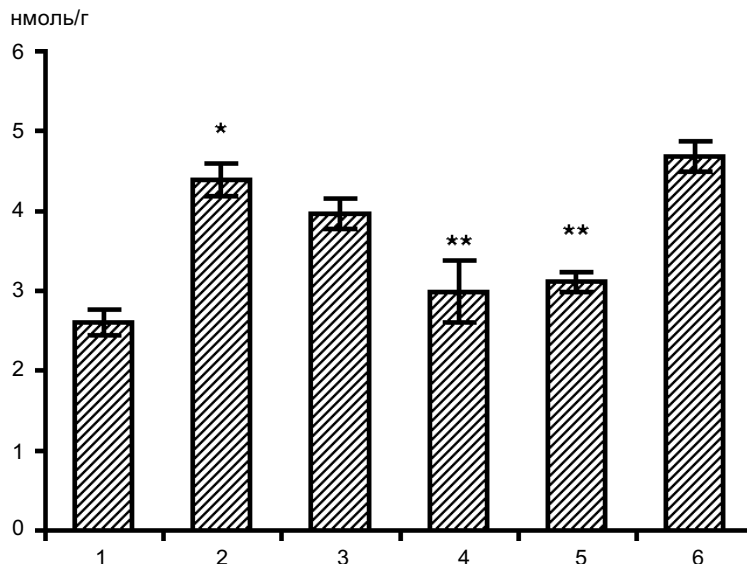


Рис. 2. Зміни вмісту ТБК-реактивних продуктів у тканині печінки щурів під впливом блокаторів адрено- та холінорецепторів, інтермедіатів циклу трикарбонових кислот і гострої гіпоксії: 1 – контроль, 2 – гостра гіпоксія, 3 – сукцинат і гостра гіпоксія, 4 – α -кетоглутарат натрію і гостра гіпоксія, 5 – адреноблокатори, сукцинат і гостра гіпоксія, 6 – холіноблокатори, α -кетоглутарат і гостра гіпоксія.

* вірогідні зміни ($P < 0,05$) між гострою гіпоксією і контролем, ** вірогідні зміни між гіпоксією і введенням препаратів.

суттєво підвищувало активність глутатіонредуктази при гострій гіпоксії. Додавання КГЛ, навпаки, значно підвищувало активність каталази та глутатіонпероксидази, суттєво не змінюючи активність глутатіонредуктази. Адреноблокатори вірогідно не впливали на активність каталази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази при доданні СК, а холіноблокатори повністю усували ефекти додання КГЛ на активність цих ферментів при гіпоксії.

Таким чином, блокатори адрено- та холінорецепторів значно модифікують активність ферментів першого й другого рівня антиоксидантного захисту. Найбільший ефект відмічено щодо введення КГЛ, який за умов гострої гіпоксії виявляє виражений протекторний ефект завдяки зниженню інтенсивності процесів ПОЛ і модуляції активності основних ферментів системи антиоксидантного захисту. Наші результати свідчать, що такий вплив КГЛ в організмі опосередковується холінорецепторами.

Дані літератури доводять, що за умов гіпоксії з крові утилізується L-аргінін з

утворенням оксиду азоту і його продуктів метаболічного обміну – аніонів NO_3^- і NO_2^- . Нітрит-аніони здійснюють акцептування електронів цитохромоксидазою за гіпоксичних умов. Тому активація циклу оксиду азоту [14] пов'язана з використанням ефективних продуктів його метаболізму – нітратів і нітритів – для економічних у енергетичному відношенні реакцій, пов'язаних передусім з функціонуванням цГМФ. Посилення холінергічних регуляторних впливів за участю цГМФ викликає зниження потреби тканин у кисні й інтенсивності процесів ліпопероксидації. Наші результати вказують на те, що введення КГЛ за умов гострої гіпоксії стимулює продукцію оксиду азоту, оцінену за підвищенням у тканині печінки вмісту його стабільного метаболіту нітрит-аніона. Ефекти стимуляції для КГЛ були значно вищими порівняно з такими для СК. Отже, генерація оксиду азоту за L-аргінінзалежним шляхом під впливом КГЛ може виступати додатковим альтернативним і не менш важливим порівняно з СК чинником корекції за умов зниженого pO_2 . Тому домінуюча роль СК, який може модифіку-

Стан системи антиоксидантного захисту за умов дії блокаторів холіно- і адренорецепторів та інтермедіатів циклу Кребса ($M \pm m$, $n=6$)

| Умови досліджу | Супероксид-дисмутаза, од. акт. · мг ⁻¹ · хв ⁻¹ | Каталаза, мкмоль · хв ⁻¹ · л ⁻¹ | Глутатіонпероксидаза, мкмоль · хв ⁻¹ · г ⁻¹ | Глутатіонредуктаза, мкмоль НАДФН · хв ⁻¹ · мл ⁻¹ |
|--|--|---|---|--|
| Контроль | 230,41±40,59 | 118,39±14,12 | 119,39±14,36 | 38,50±2,09 |
| Гостра гіпоксія | 316,33±34,56 | 78,54±7,58* | 69,51±7,39** | 18,70±1,45** |
| Сукцинат і гостра гіпоксія | 396,39±56,31 | 69,31±6,89 | 78,56±9,96 | 39,26±5,66** |
| α-кетоглутарат натрію і гостра гіпоксія | 412,87±48,52 | 139,66±15,23** | 136,59±12,33** | 25,56±5,89 |
| Адреноблокатори, сукцинат і гостра гіпоксія | 341,21±32,14 | 65,39±6,14 | 51,39±9,51 | 29,56±5,78 |
| Холіноблокатори, α-кетоглутарат натрію і гостра гіпоксія | 204,63±36,45*** | 61,13±5,56*** | 59,34±8,16*** | 19,87±4,15 |

* вірогідні зміни ($P < 0,05$) щодо контролю та гострої гіпоксії;

** – щодо гострої гіпоксії та введення препаратів; *** – щодо блокади рецепторів і введення препаратів при гострій гіпоксії.

вати ефекти окиснення інших субстратів циклу Кребса, і насамперед КГЛ, нами розглядається як конкурентний механізм впливу у “боротьбі” за кисень дихального ланцюга МХ.

Поряд з хімічною взаємодією оксиду азоту і супероксидного радикала, регуляторне значення має взаємовплив сигнальних механізмів NO і АФК. Зокрема, гальмування функцій МХ NO-залежними механізмами [17] призводить до збільшення утворення АФК. Внаслідок взаємодії NO з супероксидом зворотне інгібування дихання МХ стає незворотним через внутрішньоклітинне утворення пероксинітриду [14]. Гіпоксія викликає опосередковане пероксинітридом інгібування дихання і пряме відношення до цього мають іони супероксиду, які утворюються в ендотелії судин під впливом циклооксигенази та ксантиноксидази. Значна роль відводиться за цих умов перекису водню, який викликає ендотеліозалежну та простагландиннезалежну реакції дилатації. Ці механізми зумовлені збільшенням під впливом перекису водню вмісту клітинного кальцію, який може брати участь у стимуляції NOS. Крім того, NO може інгібувати активність каталази та її участь у пероксидзалежній стимуляції розчинної гуанілатциклази. Взаємодія сигнальних систем NO і АФК залежать від їх фізіологічних концентрацій, необхідних для прояву ефектів на клітинному рівні, і стану рецепторів.

Таким чином, гостра нестача кисню у вдихуваному повітрі посилює роль рецепторних структур у підтриманні механізмів енергозабезпечення МХ. Якщо блокада адренорецепторів посилює ефекти окиснення НАД-залежних субстратів, зокрема КГЛ, то блокатори холінорецепторів, навпаки, нівелюють ефекти стабілізуючої дії екзогенного КГЛ за цих умов. Це свідчить про важливе значення холінорецепторних структур і оксиду азоту в

підтриманні вільнорадикального гомеостазу за умов гострої гіпоксії.

N.M.Kurhalyuk, T.V.Serebrovskaya

ROLE OF KREBS CYCLE INTERMEDIATES IN LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY UNDER ACUTE HYPOXIA

The object of this study was to investigate the effects of exogenous succinate (SC) and α -ketoglutarate (KGL) on intensity of NO metabolism, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in rat liver tissues under acute hypoxia (AH). Six groups of Wistar male rats participated in the study. Animals of Gr.I underwent i.p. saline injection, Gr.II - saline injection and AH (inhalation of 7% O₂, 30 min). Gr. III and IV were examined after i.p. injection of SC (50 mg/kg) or KGL (200 mg/kg) and AH test; Gr. V - after i.p. injection of SC with α - β -adrenoblockers phentolamine and obzidan (2 mg each) and AH test, Gr. 6 - after i.p. injection of KGL with M- and N-cholinoreceptor blockers atropine (5 mg) and benzohexonium (10 mg) and AH test. It was shown that AH provoked the decrease of NO production by 34%, the addition of SC augmented twice the nitrite anion content, the addition of KGL - in three times. KGL decreased malon dialdehyde content under AH by 32% and SC- by 25%. The least level of lipid peroxidation was registered in Gr.VI. Adrenoblockers did not influence on antioxidant enzymes activity under AH, but cholinoblockers completely eliminated the increase of SOD, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities under KGL treatment. We conclude that nitric oxide production under α -ketoglutarate influence is mediated by cholinoreceptors.

*Ivan Franko Lviv National University; A.A.Bogomoletz
Institute of Physiology Ukrainian Academy of Sciences, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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. - 33, № 1. - С. 118 - 122.
2. Герасимов А.М., Деленян Н.В., Шаов М.Т. Формирование системы противокислородной защиты организма. - М., 1998. - 187 с.
3. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. - Минск.: Беларусь, 1982. - С. 219-220.
4. Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В., Бабский А.М. Хазанов В.А. Гомеостазирование физиологических функций на уровне митохондрий. - В кн.: Молекулярные механизмы клеточного гомеостаза. - Новосибирск: Наука, 1989. - С. 40 - 66.

5. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – 1. – С. 16 – 19.
6. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.И. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – 36, №2 – С. 88 – 91.
7. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетические механизмы формирования гипоксических состояний и подходы к их фармакологической коррекции. – В кн.: Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. – М., 1989. – С. 11 – 44.
8. Маевский Е.И., Гришина Е.В., Розенфельд А.С. и др. Сукцинат – продукт анаэробных превращений и гипоксический субстрат. – В кн.: Гипоксия, механизмы, адаптация, коррекция: Труды Второй Всерос. конф. – М., 1999. – С. 43 – 44.
9. Мальшев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. – 63, № 7. – С. 992 – 1006.
10. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – №12. – С. 724 – 727.
11. Тимирбулатов Т.А., Селезнев С.И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Там же. – 1986. – №4. – С. 209 – 211.
12. Путилина Ф.Е. Определение активности глутатионредуктазы. – В кн.: Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – С. 181 – 183.
13. Серебровська Т.В., Кургалюк Н.М., Носар В.І., Колеснікова Є.Е. Вплив інтервальних гіпоксичних подразнень та екзогенного оксиду азоту на процеси енергозабезпечення та ліпопероксидації у печінці щурів за умов гострої гіпоксії // Фізіол. журн. – 2001. – 47, №1. – С. 85 – 92.
14. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.
15. Brown G. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase / FEBS Lett. – 1995. – 369. – P. 136 – 139.
16. Green L.C., David A.W., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] – nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – 126, № 1. – P. 131-138.
17. Gross S., Wolin M. Nitric oxide: pathophysiological mechanism // Annu Rev. Physiol. – 1995. – 57. – P. 737 – 769.

*Львів. ун-т ім. І. Франка М-ва освіти і науки України;
Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ*