

А.Ю. Богуславський, А.В. Дмитрієва, В.Ф.Сагач

## Вплив оксиду азоту на ефективність використання кисню працюючим скелетним м'язом при його стомленні

*Исследовано влияние NO на эффективность использования кислорода скелетной мышцей в условиях развития утомления икроножной мышцы собаки. В контрольной серии экспериментов было показано, что 10 кратковременных электрических стимуляций приводили к выраженному уменьшению силы мышечных сокращений и резкому повышению кислородной стоимости работы икроножной мышцы, относительно исходных показателей. Зарегистрированное угнетение силы мышечных сокращений свидетельствовало о развитии утомления икроножной мышцы собаки, что сопровождалось появлением в венозной крови, оттекающей от работающей мышцы, митохондриального фактора (МФ), который, как показано нами ранее, является маркером открытия МП. Предварительное введение блокатора NO синтаз N<sup>G</sup>- монометил-L-аргинина (L-NMMA) приводило к существенному уменьшению исходных показателей силы мышечных сокращений по сравнению с контролем. При этом кислородная стоимость работы икроножной мышцы на протяжении ее нагрузки значительно превышала контрольные показатели. Развитие утомления икроножной мышцы на фоне действия L-NMMA сопровождалось, как и в контроле, открытием МП. Использование донора NO нитропруссида натрия предупреждало угнетение силы мышечных сокращений и снижение эффективности использования кислорода работающей мышцей при условиях, аналогичных контрольным. При этом утомление икроножной мышцы не развивалось, а концентрация МФ в оттекающей от работающей мышцы крови была существенно ниже, чем в контроле, что свидетельствовало об отсутствии открытия МП. Предварительная кратковременная электрическая стимуляция, по-видимому, создавала эффект прекондиционирования и повышала уровень аутентичного NO. В этих условиях, как и при введении донора NO, мы не регистрировали угнетения эффективности использования кислорода и развития утомления икроножной мышцы. В то же время МФ в оттекающей от работающей мышцы крови практически отсутствовал, что свидетельствовало об отсутствии открытия МП. Таким образом, NO в физиологических концентрациях, ингибируя открытие МП, может предупреждать снижение эффективности использования кислорода и развитие утомления работающей скелетной мышцы.*

### ВСТУП

У класичних роботах Г.В. Фольборта та П.М. Серкова показано, що характерними ознаками стомлення скелетного м'яза є, перш за все, виразне пригнічення сили м'язових скорочень, формування некомпенсованої кисневої заборгованості та накопичення кислих продуктів метаболізму. Адекватне кровопостачання працюючого м'яза

реалізується внаслідок розвитку робочої (функціональної) гіперемії. Нині вже відомі основні її механізми та встановлено, що головну роль серед них відіграє NO [5, 12].

Водночас є дані, що NO впливає на активність мітохондріальних дихальних комплексів, регулюючи клітинне дихання [16–18, 20]. Крім того, NO збільшує доступність субстрату окиснення (глюкози) [8], є фізіологічним модулятором скорочу-

вальної активності м'язів і споживання кисню міокардом [16, 20]. У попередніх дослідях на ізольованому серці було показано, що NO здатний регулювати не лише споживання кисню серцевим м'язом, а також і кисневу вартість роботи міокарда [6]. Також нещодавно з'явилися відомості, що NO впливає на чутливість мітохондріальної пори (МП) до індукторів відкриття [10]. На жаль, більшість експериментів були виконані на ізольованих мітохондріях або клітинах, невелика кількість – на ізольованому серці, а отримані дані суперечливі. Проведення досліджень впливу NO на чутливість МП *in vivo* ускладнюється тим, що існуючі методики визначення відкриття МП [11, 13] неможливо застосовувати в умовах цілісного організму та паралельно реєструвати функціональні показники роботи органа.

Нами було розроблено метод визначення відкриття МП *in vivo* за допомогою реєстрації у відтікаючій від органа крові мітохондріального фактора (МФ), який за нашими даними є маркером відкриття МП [2, 4, 7]. Цей метод дає можливість визначити відкриття МП і паралельно реєструвати інші фізіологічні показники. Використовуючи розроблений метод, було встановлено, що NO та відкриття МП мають велике значення для регуляції силових і кисневих показників роботи скелетного м'яза [3]. Саме тому метою цієї роботи стало дослідження впливу NO на ефективність використання кисню працюючим скелетним м'язом при його стомленні.

## МЕТОДИКА

Досліди виконано на 20 безпородних собаках з премедикацією кетаміном (5 мг/кг, внутрішньом'язово) під хлоралозо-уретановим наркозом (0,05 та 0,5 г/кг, внутрішньовенно). Як антикоагулянт в експериментах використовували гепарин у дозі 500 од/кг. Було проведено чотири серії експериментів:

контрольна, серії з використанням інгібітора NO-синтази і донора NO та серія з попереднім навантаженням.

Під час операційної підготовки відпрепарували та катетеризували праву яремну вену, а також судини правого стегна – стегової артерію та вену. В дослідях реєстрували: тиск у стеговій артерії за допомогою тензодатчика 746 ("Elema", Швеція) та швидкість кровотоку (ШК) за допомогою електромагнітного флоуметра РКЕ-2-БІ. Розраховували середній артеріальний тиск (САТ) і судинний опір (СО) у басейні стегової артерії. Проби крові забирали з правих стегових артерії і вени та визначали парціальне напруження кисню ( $pO_2$ ) в артеріальній і венозній крові за допомогою мікрогазоаналізатора BMS 3 Mk2 ("Radiometer", Данія). На підставі показників кровопостачання та напруження кисню розраховували споживання кисню та кисневу вартість роботи м'яза [1].

Навантаження литкового м'яза відтворювали за схемою: 10 короткотривалих (30 с) електричних стимуляцій (8 Гц, 5 мс, 20 В) з інтервалом 5 с. Час відпочинку між пачками стимуляцій становив не менше ніж 20–25 хв. В останній серії експериментів створювали ефект прекодиціонування за допомогою попередньої короткочасної стимуляції литкового м'яза за схемою: три 30-секундні електричні стимуляції (8 Гц, 5 мс, 20 В) з інтервалами 2 хв. Інтервал між попередньою стимуляцією та початком навантаження литкового м'яза був 10 хв. М'язові скорочення відтворювали в режимі наближеному до ізометричного. Силу м'язових скорочень реєстрували за допомогою тензометричного датчика.

Реєстрацію всіх показників регіонарної гемодинаміки та скорочувальної активності м'яза проводили синхронно за допомогою полікардіографа Mingograf-82 ("Siemens-Elema", Німеччина–Швеція). Проміжні результати й оригінальні записи показників регіонарної гемодинаміки та скорочувальної активності м'яза обробляли за допомо-

гою програм Global Lab V2.4 та ORIGIN 6.0.

У досліджах використовували інгібітор NO-синтази (NOS)  $N^G$ - монометил-L-аргінін (L-NMMA, «Sigma», США) в дозі 2,7 мг/кг. Препарат, розведений у 20 мл фізіологічного розчину, повільно вводили в стегнову артерію при зупинці кровопостачання кінцівки на 5 хв з наступним відновленням кровотоку. L-NMMA вводили за 15–20 хв до початку електричних стимуляцій. Донор NO – нітропрусид натрію (0,2 мг/кг), розчинений в 20 мл фізіологічного розчину, повільно вводили тваринам у праву стегнову вену за 20–25 хв до початку електричних стимуляцій.

Проби крові для спектрофотометричного аналізу відбиралися у вихідному стані та після п'ятої стимуляції м'яза. Визначення МФ у пробах крові проводили за методикою, описаною раніше [2]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При навантаженні литкового м'яза відбувалося поступове підвищення ШК у басейні стегнової артерії. Максимальні значення функціональної гіперемії реєстрували на 10-й стимуляції (рис. 1, а). При цьому ШК

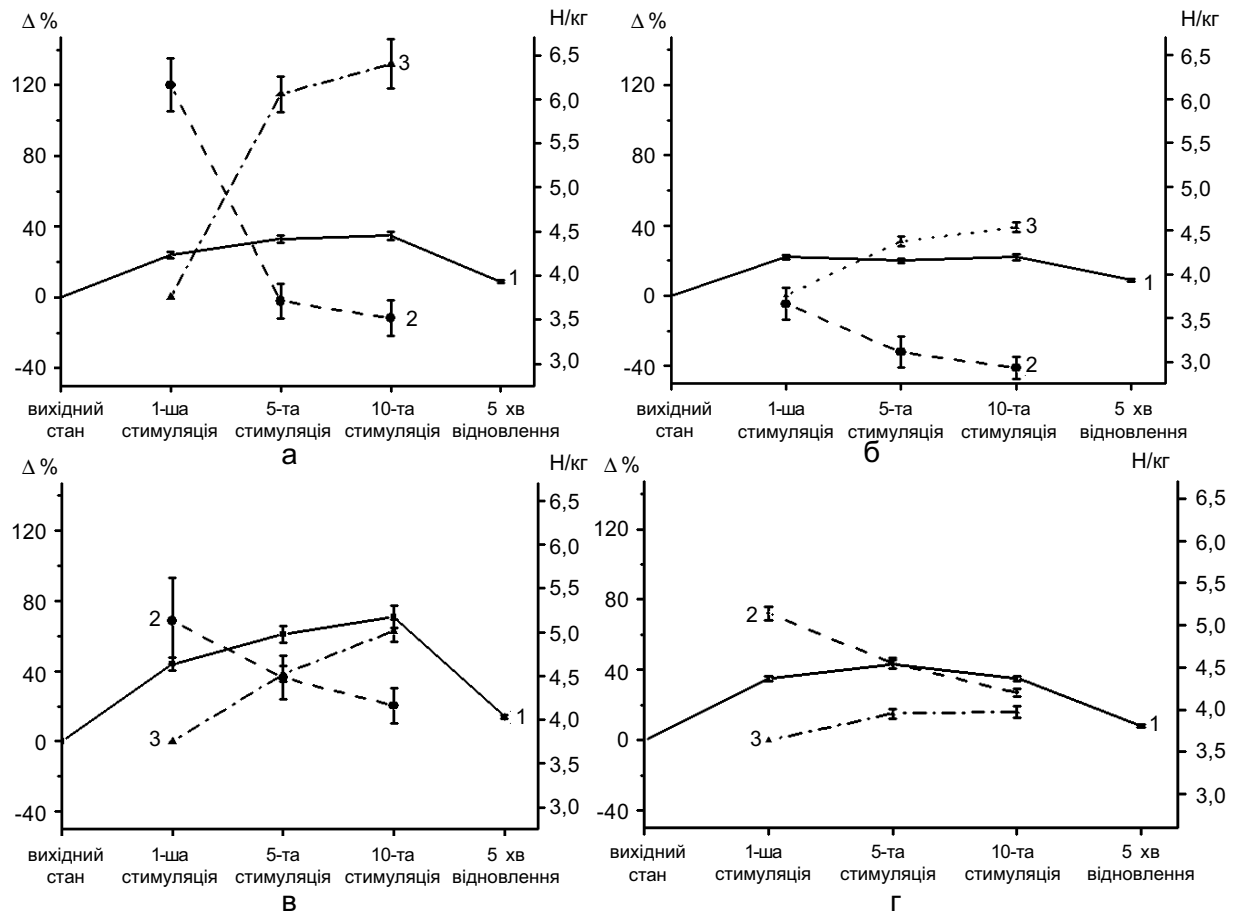


Рис. 1. Зміни амплітуди робочої гіперемії (1), сили (2) і кисневої вартості роботи (3) при електричній стимуляції литкового м'яза в контрольних умовах (n=10; а), після попереднього введення L-NMMA (n=6, 2,7 мг/кг; б), після попереднього введення нітропрусиду натрію (n=6, 0,2 мг/кг; в) та після попереднього навантаження м'яза (n=6; г). Амплітуду робочої гіперемії та кисневу вартість роботи представлено у відносних величинах, силу – в абсолютних величинах

збільшувалася з  $47,5 \pm 3,59$  до  $64 \text{ мл/хв} \pm 4,58 \text{ мл/хв}$  ( $P < 0,05$ ). CO у басейні стегнової артерії поступово зменшувався впродовж усього періоду стимуляції м'яза, але максимальне його зменшення було зареєстровано під час 10-ї стимуляції:  $(1,47 \pm 0,15) \text{ мм рт. ст.} \cdot \text{хв} \cdot \text{мл}^{-1}$  порівняно з  $(2,56 \pm 0,25) \text{ мм рт. ст.} \cdot \text{хв} \cdot \text{мл}^{-1}$  ( $P < 0,001$ ) у вихідному стані. Незважаючи на збільшення ШК у басейні стегнової артерії, сила м'язових скорочень знижувалася вже після 2-ї стимуляції, а після 5-ї – відбувалося вірогідне пригнічення скорочувальної активності литкового м'яза: сила м'язових скорочень під час 5-ї стимуляції становила  $3,71 \text{ Н/кг} \pm 0,2 \text{ Н/кг}$  порівняно з  $6,16 \text{ Н/кг} \pm 0,3 \text{ Н/кг}$  ( $P < 0,01$ ) під час 1-ї стимуляції (див. рис. 1,а). Прогресуюче зниження сили м'язових скорочень відбувалося до 10-ї стимуляції ( $3,52 \text{ Н/кг} \pm 0,2 \text{ Н/кг}$ ;  $P < 0,01$ ). Різке та виразне пригнічення скорочувальної активності литкового м'яза протягом серії з 10-ти електричних стимуляцій супроводжувалося значним підвищенням кисневої вартості його роботи м'яза (див. рис. 1,а). Так, якщо киснева вартість роботи литкового м'яза при 1-й стимуляції становила  $(99 \pm 8,16) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$ , то на 5-й стимуляції вона була вже  $(212 \pm 17,7) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$  ( $P < 0,01$ ), а на 10-й – ми реєстрували подальше збільшення цього показника до  $(256 \pm 15,18) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$  ( $P < 0,01$ ). Виразне пригнічення скорочувальної активності та ефективності використання кисню (рис. 2,а) при навантаженні литкового м'яза свідчило про розвиток його стомлення.

Спектрофотометричний аналіз проб сироватки крові, зібраних зі стегнової вени після 5-ї стимуляції литкового м'яза, коли було зареєстровано вірогідне зменшення сили м'язових скорочень, показав наявність у сироватці крові МФ [2, 7]. Ми спостерігали збільшення амплітуди оптичної густини розчину на  $0,272 \pm 0,02$  у діапазоні хвиль 240–250 нм (рис. 3). Вміст МФ, зареєстрований за умов стомлення скелетного м'яза,

майже не відрізнявся від показників, отриманих нами при ішемії–реперфузії серця чи застосування активатора МП феніларсин-оксиду (ФАО) [2, 15].

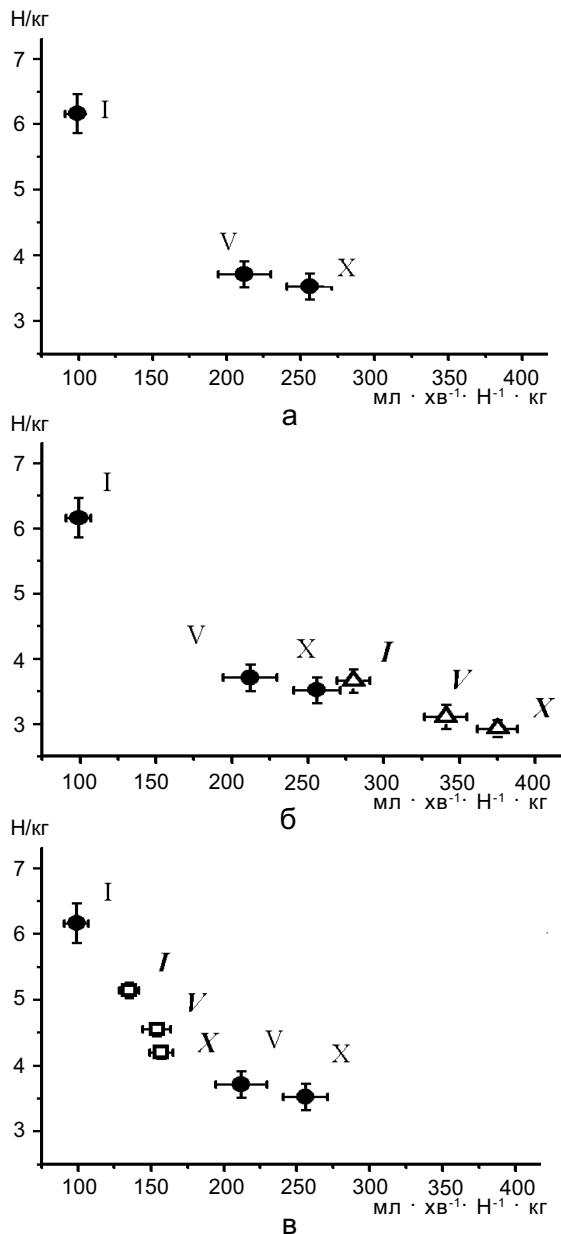


Рис. 2. Співвідношення сили та кисневої вартості роботи литкового м'яза при моделюванні стомлення в контролі ( $n=10$ , кільця), при попередньому введенні L-NMMA ( $n=6$ , 2,7 мг/кг; трикутники), після прекондичіонування ( $n=6$ , квадрати). Римські цифри – порядковий номер стимуляції

Отже, розвиток стомлення литкового м'яза супроводжується появою у пробах сироватки крові високого рівня МФ, що свідчить про відкриття МП. Саме це може спричиняти виразне пригнічення сили м'язових скорочень та істотне зменшення ефективності використання кисню працюючим м'язом.

Літературні дані та результати наших досліджень свідчать про те, що NO спроможний впливати на дихальні ензиматичні комплекси мітохондрій, регулюючи кисневі показники роботи м'яза, а також є модулятором активності МП [3, 10, 16–18, 20]. Саме тому ми вирішили дослідити значення цього ендотеліального аутокоїда у регуляції ефективності споживання кисню працюючим м'язом у процесі його стомлення. Для цього було проведено досліди, в яких моделювали стомлення литкового м'яза за умов попереднього введення блокатора NOS – L-NMMA або донора NO – нітропрусида натрію.

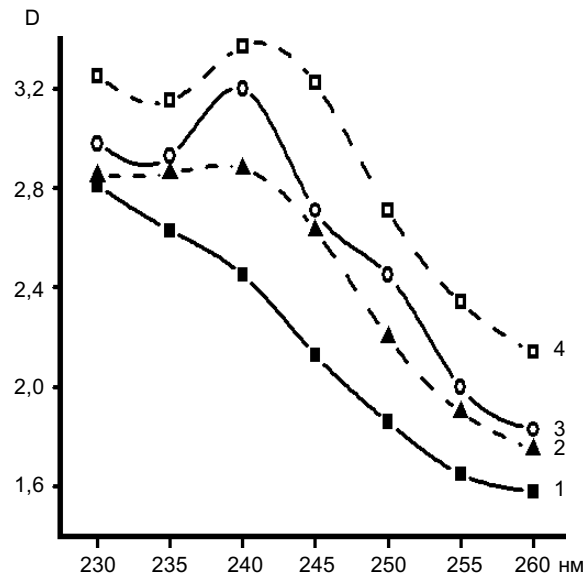


Рис. 3. Зміни оптичної густини поглинання сироватки крові відтікаючої від литкового м'яза: 1 – до стимуляції; 2 – після 5-ї стимуляції на фоні дії нітропрусида натрію (0,2 мг/кг) або після прекодиціонування; 3 – після 5-ї стимуляції в контрольних умовах; 4 – після 5-ї стимуляції на фоні дії L-NMMA (2,7 мг/кг)

Попереднє введення блокатора NOS істотно змінювало гемодинамічні показники під час електричної стимуляції литкового м'яза. Так, за умов пригнічення синтезу NO максимальне збільшення ШК відбувалося після 10-ї стимуляції литкового м'яза з  $45 \pm 2,3$  до  $55 \text{ мл/хв} \pm 2,7$  мл/хв і було вірогідно нижчим за контрольні значення (див. рис. 1,б). Зміни CO під час розвитку стомлення литкового м'яза також були менше виразні на фоні блокади NOS. При цьому максимальне зменшення цього показника становило  $31\% \pm 2,8\%$ , а в контролі –  $43\% \pm 3,2\%$  ( $P < 0,01$ ). Отримані результати свідчать, що застосування L-NMMA призводило до пригнічення ендотеліальної робочої гіперемії та істотно зменшувало кровопостачання працюючого м'яза. Одночасно було зареєстровано суттєве зменшення сили м'язових скорочень у відповідь на електричну стимуляцію (див. рис. 1,б). Так, сила м'язових скорочень на 1-й стимуляції становила лише  $3,66 \text{ Н/кг} \pm 0,18 \text{ Н/кг}$ , що значно менше ніж, у контролі. Протягом наступних стимуляцій цей показник зменшувався і на 5-й стимуляції становив  $3,11 \text{ Н/кг} \pm 0,18 \text{ Н/кг}$ , а на 10-й –  $2,93 \text{ Н/кг} \pm 0,13 \text{ Н/кг}$ , що значно менше щодо контролю. Пригнічення скорочувальної активності литкового м'яза за умов блокади синтезу NO супроводжувалося різким підвищенням кисневої вартості роботи м'яза. Так, уже на 1-й стимуляції вона становила  $(280 \pm 11) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$ . Упродовж наступних стимуляцій м'яза відбувалося подальше пригнічення ефективності використання кисню працюючим м'язом (див. рис. 2,б). На 5-й стимуляції киснева вартість роботи м'яза збільшувалася до  $(341 \pm 14) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$ , а на 10-й – до  $(375 \pm 13) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$ . Слід зазначити, що на фоні дії блокатора NOS не відбувалося такого різкого збільшення кисневої вартості роботи литкового м'яза протягом його навантаження, як ми реєстрували в контролі, тому що в цій серії

дослідів уже вихідний рівень був дуже високим. Таким чином, на фоні дії L-NMMA вихідні силові та кисневі показники роботи литкового м'яза свідчили про значно гірший його функціональний стан порівняно з контрольним.

Проведення спектрофотометричного аналізу проб сироватки крові, зібраних із стегнової вени після 5-ї стимуляції литкового м'яза на фоні дії блокатора NOS L-NMMA, показало наявність у ній значної концентрації МФ. Підвищення амплітуди оптичної густини поглинання у відтікаючій крові становило  $0,22 \pm 0,02$ , що вірогідно не відрізнялося від контрольних значень (рис. 3). Одержані спектрофотометричні результати вказують на те, що стомлення литкового м'яза на фоні дії L-NMMA супроводжується відкриттям МП.

Таким чином, за умов блокади синтезу NO відбувалося пригнічення ендотеліальної реакції функціональної гіперемії, а також зменшення сили м'язових скорочень і виразне зниження ефективності використання кисню працюючим м'язом (див. рис. 2,б)

У наступній серії експериментів, премедикація донором NO нітропрусидом натрію істотно збільшувала амплітуду функціональної гіперемії порівняно з контролем (див. рис. 1,в). Пік гіперемічної реакції було зареєстровано на 10-й стимуляції ( $101 \text{ мл/хв} \pm 8,72 \text{ мл/хв}$ ), що вірогідно вище за відповідні контрольні показники ( $P < 0,001$ ). Збільшення функціональної гіперемії відбувалося, насамперед, внаслідок зниження СО. Таким чином, за умов попереднього введення екзогенного донора NO, значно поліпшувалася ендотеліальна реакція функціональної гіперемії, що збільшувало кровопостачання працюючого м'яза. Водночас позитивно відрізнялася динаміка сили м'язових скорочень (див. рис. 1,в). Слід зазначити, що на 1-й стимуляції вона була дещо меншою, ніж в інтактних умовах і становила  $5,13 \text{ Н/кг} \pm 0,49 \text{ Н/кг}$ . Це, на

нашу думку, можна пояснити дією екзогенного донора NO, який здатний викликати дозозалежне зменшення сили скорочень [17, 19]. Проте протягом подальшого навантаження м'яза за цих умов пригнічення скорочувальної активності *m. gastrocnemius* не мало такого вираженого прогресуючого характеру, як у контрольних дослідах (див. рис. 1,а). Так, під час 5-ї стимуляції за цих умов сила м'язових скорочень становила  $4,48 \text{ Н/кг} \pm 0,25 \text{ Н/кг}$ , що вірогідно більше за значення, зареєстровані в контролі ( $P < 0,05$ ). На 10-й стимуляції цей показник становив  $4,16 \text{ Н/кг} \pm 0,2 \text{ Н/кг}$ , що також суттєво перевищує контрольні значення. Отже, в цій серії дослідів пригнічення скорочувальної активності впродовж навантаження м'яза було більше ніж удвічі меншим, порівняно з контрольними реакціями. Одержані результати свідчать про те, що премедикація екзогенним донором NO попереджала розвиток стомлення. Премедикація нітропрусидом натрію також запобігала різкому зменшенню ефективності використання кисню литковим м'язом протягом його навантаження (див. рис. 1,в). Хоча слід зазначити, що абсолютні значення кисневої вартості роботи м'яза були вищими порівняно з контролем і становили при 1-й стимуляції м'яза –  $(201 \pm 25) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$ , на 5-й –  $(272 \pm 27) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$  і на 10-й –  $(297 \pm 18) \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{кг}$ . Це зумовлено значним збільшенням ШК у басейні стегнової артерії під впливом нітропрусиду натрію (тоді як артеріовенозна різниця за вмістом кисню змінювалася невірогідно), що в свою чергу значно збільшило значення кисневої вартості роботи, яка є розрахунковим показником. Проте навіть за цих умов розрахована киснева вартість роботи була вірогідно меншою, ніж у попередній серії дослідів на фоні дії L-NMMA ( $P < 0,01$ ).

Ми провели спектрофотометричні вимірювання проб плазми крові, зібраних зі

стегнової вени після 5-ї стимуляції литкового м'яза на фоні дії нітропрусиду натрію, які показали, що МФ за цих умов практично відсутній (див. рис. 3). Зареєстроване підвищення амплітуди оптичної густини поглинання у відтікаючій крові становило  $0,012 \pm 0,001$ , що значно менше, ніж у контролі (більше ніж у 20 разів) та за умов дії блокатора NOS ( $P < 0,001$ ).

Таким чином, попереднє введення нітропрусиду натрію істотно збільшувало перфузію кров'ю працюючого м'яза, попереджало виражене зменшення сили м'язових скорочень, а також запобігало різкому зниженню ефективності використання кисню м'язом протягом його навантаження. Відкриття МП ми при цьому не зареєстрували. Стомлення литкового м'яза не розвивалося.

Відомо, що ефективним нефармакологічним інгібітором відкриття МП є попереднє прекодиціонування [9, 14]. Під прекодиціонуванням розуміють короткотривалі впливи субмаксимальної інтенсивності, які підвищують стійкість органа чи організму до дії наступного довготривалого та більш інтенсивного негативного чинника [9]. Одним із механізмів дії ефекту прекодиціонування може бути активація мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів, яка стимулює клітинні антиоксидантні системи, що в свою чергу сприяє зменшенню чутливості МП до дії її індукторів [14]. Також показано, що в реалізації ефекту прекодиціонування активну участь бере система аутентичного NO [9].

Саме тому ми вирішили дослідити вплив попереднього м'язового навантаження, яке, можливо, має ефект прекодиціонування та підвищує рівень ендогенного NO, на розвиток модельного стомлення м'яза. В цій серії дослідів, ШК у басейні стегнової артерії протягом навантаження литкового м'яза мала тенденцію до збільшення порівняно з контрольними значеннями (див. рис. 1,г). При цьому вже на 1-й

стимуляції м'яза ШК була  $69 \text{ мл/хв} \pm 2,6 \text{ мл/хв}$ , що вірогідно більше від контролю ( $P < 0,05$ ). Максимально ШК збільшувалася до  $73 \text{ мл/хв} \pm 4,03 \text{ мл/хв}$ , що також перевищувало контрольний рівень ( $P < 0,05$ ). Зміни СО практично не відрізнялися від реакцій, зареєстрованих у контролі, а силові показники роботи м'яза в цій серії значно відрізнялися (див. рис. 1,г). Після прекодиціонування не відбувалося різкого та істотного пригнічення скорочувальної активності литкового м'яза протягом навантаження, як це було в контролі. При цьому сила м'язових скорочень на 5-й стимуляції зменшувалася лише на  $12\% \pm 1,3\%$ , що вірогідно відрізняється від показників, зареєстрованих у контролі (див. рис. 1,а). На 10-й стимуляції зменшення сили м'язових скорочень відносно вихідних значень становило  $18\% \pm 1,06\%$ , тоді як у контролі цей показник був  $43\% \pm 2,3\%$  ( $P < 0,01$ ). При цьому киснева вартість роботи протягом навантаження литкового м'яза не підвищувалася так виразно, як у контролі (див. рис. 1,г). Збільшення кисневої вартості роботи на 5-й і на 10-й стимуляції м'яза було в 8–9 разів нижчим за контрольні значення ( $P < 0,001$ ). Зареєстровані в цій серії дослідів силові та кисневі показники роботи литкового м'яза свідчать, що після прекодиціонування стомлення м'яза не розвивалося.

Спектрофотометричні вимірювання проб сироватки крові, зібраних зі стегнової вени після 5-ї стимуляції литкового м'яза при попередньому прекодиціонуванні показали, що концентрація МФ за цих умов дуже низька (див. рис. 3). Зареєстрована амплітуда оптичної густини поглинання у відтікаючій крові становила лише  $0,028 \pm 0,0018$ , що вірогідно менше, ніж у контролі ( $P < 0,001$ ).

Таким чином, проведення прекодиціонування пригнічує відкриття МП, а також попереджає виразне зменшення сили м'язових скорочень і зниження ефектив-

ності використання кисню працюючим литковим м'язом (див. рис. 2,в) протягом його навантаження. Стомлення м'яза за цих умов не розвивалося.

Одержані результати свідчать, що сила скорочень литкового м'яза впродовж стимуляцій у контрольній серії експериментів прогресивно знижується (див. рис. 1,а). Під час 5-ї стимуляції це зменшення було настільки виразним ( $40\% \pm 2,9\%$ ), що можна було говорити про розвиток стомлення литкового м'яза. Слід зазначити, що за літературними даними критерієм стомлення скелетного м'яза є значне пригнічення скорочувальної активності, при якому сила м'язових скорочень знижується більше ніж на 30 % порівняно з вихідним рівнем. Протягом наступних стимуляцій скорочувальна активність литкового м'яза зазнавала подальшого пригнічення. Серед чинників, які зумовлюють таке зменшення сили скорочень литкового м'яза, на нашу думку, можна виділити робочу гіпоксію та різке підвищення міоплазматичної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Важливо, що вираженість дії цих чинників знаходиться в прямій залежності від інтенсивності та тривалості навантаження м'яза. Впродовж навантаження виснажується енергетичний потенціал скелетного м'яза, що супроводжується поглибленням робочої гіпоксії, подальшим збільшенням цитоплазматичної концентрації кальцію, що, в свою чергу, може призвести до відкриття МП [11, 13]. Дійсно, після 5-ї стимуляції ми реєстрували в крові, відтікаючої від працюючого м'яза, значну концентрацію МФ, що свідчило про відкриття МП. Отримані дані збігаються зі спектрофотометричними показниками, які ми реєстрували за умов ішемії–реперфузії серця чи застосування хімічного активатора МП ФАО [2, 3] та вірогідно відрізняються від показників, зареєстрованих за умов дії антиоксиданта мелатоніну чи селективного блокатора відкриття МП циклоспорину А. Відомо, що відкриття МП

призводить до пригнічення клітинного дихання, різкого порушення синтезу АТФ і вільнорадикального вибуху [11, 13]. За цих умов відбувається виразне зменшення сили м'язових скорочень та ефективності використання кисню працюючим м'язом: можливо, кисень, який потрапляє до м'яза з кров'ю, не тільки використовується в циклі реакцій, спрямованих на синтез АТФ, а й збільшує вміст вільнорадикальних сполук. Отримані результати збігаються з даними наших попередніх досліджень, в яких ми зареєстрували істотне пригнічення сили м'язових скорочень та значне підвищення кисневої вартості роботи литкового м'яза при попередньому введенні активатора МП ФАО [3].

У наступній серії експериментів попереднє введення інгібітора NOS L-NMMA призводило до виразного пригнічення навіть вихідних силових і кисневих показників роботи м'яза (див. рис. 1,б) порівняно з контролем. Слід зазначити, що близькі за значенням результати були зареєстровані в наших попередніх дослідженнях з поодинокими стимуляціями литкового м'яза на фоні дії L-NMMA [3]. Під час подальшого навантаження литкового м'яза спостерігалось максимальне зменшення сили м'язових скорочень (див. рис. 1,б). Ефективність використання кисню працюючим м'язом за цих умов також значно пригнічувалася. Такі результати можна пояснити тим, що при застосуванні L-NMMA вже вихідні значення кисневої вартості роботи більш ніж у 2,8 раза перевищують контроль. Саме тому, на нашу думку, збільшення кисневої вартості роботи за умов пригнічення NOS не могло відбуватися такою мірою, як це було в контролі. Таке виразне пригнічення силових і кисневих показників роботи литкового м'яза при попередньому введенні L-NMMA можна пояснити тим, що NO в фізіологічних дозах позитивно впливає на скорочувальну активність скелетних м'язів [17, 19], а також на активність мітохондріальних



дихальних комплексів, регулюючи інтенсивність клітинного дихання, енергоутворення і чутливість МП до відкриття [16–18, 20]. Саме тому зменшення вмісту цього ендотеліального аутокоїда, з одного боку, істотно підсилювало вираженість робочої гіпоксії та порушень кальцієвого гомеостазу, а з іншого – підвищувало чутливість МП до дії різних чинників відкриття. Комплексна дія цих негативних чинників реалізувалася за принципом замкнених підсилюючих контурів та істотно пригнічувала як вихідний функціональний стан литкового м'яза, так і показники його роботи під час моделювання стомлення.

Застосування донора NO зменшувало чутливість МП до дії індукторів та попереджало її відкриття (див. рис. 3). У свою чергу, це усувало різке пригнічення сили м'язових скорочень і зниження ефективності використання кисню працюючим м'язом протягом його навантаження. Отже, застосування нітропрусиду натрію зменшувало негативні ефекти активації МП, значно поліпшуючи функціональний стан литкового м'яза та попереджало розвиток стомлення.

У результаті прекодиціонування підвищувався вміст аутентичного оксиду азоту, що в свою чергу ефективно попереджало відкриття МП при моделюванні стомлення литкового м'яза (див. рис. 3). Аутентичний NO, пригнічуючи чутливість МП до дії індукторів, попереджав виразне пригнічення сили м'язових скорочень та різке підвищення кисневої вартості роботи литкового м'яза при його навантаженні (див. рис. 1,г). Слід зазначити, що абсолютні значення кисневої вартості роботи за цих умов значно менші, ніж при застосуванні екзогенного донора NO. Отримані результати можна пояснити тим, що при прекодиціонуванні вміст NO підвищується адекватно до інтенсивності навантаження та потреб працюючого органа. Відповідно, амплітуда функціональної гіперемії в цьому

разі відповідає потребам працюючого м'яза, а абсолютні значення ШК, які входять до розрахунку кисневої вартості роботи, дещо менші, ніж у дослідах із застосуванням нітропрусиду натрію. Саме тому при прекодиціонуванні значення кисневої вартості роботи м'яза вірогідно менші за відповідні показники, зареєстровані за умов попереднього введення екзогенного донора NO.

Таким чином, отримані результати свідчать, що відкриття МП бере активну участь у розвитку стомлення скелетного м'яза. Водночас NO, пригнічуючи відкриття МП, попереджає зменшення скорочувальної активності литкового м'яза, ефективності використання кисню працюючим м'язом і запобігає розвитку стомлення м'яза під час його тривалого навантаження.

**A. Y. Boguslavskiy, Dmitrieva A.V., Sagach V.F.**

#### **THE INFLUENCE OF NO ON THE EFFICIENCY OF OXYGEN USAGE BY WORKING SKELETAL MUSCLE UNDER ITS FATIGUE**

The influence of NO on the efficiency of oxygen usage by a skeletal muscle under fatigue of dog's gastrocnemius muscle was investigated. In control experiments was shown, that 10 short-term (30") electrical stimulation (8 Hz, 5 ms, 20 V) with 5" interval resulted in significant reduction of the muscle contraction force (more than 40%) and increased considerably oxygen cost of muscle gastrocnemius work (more than 130%) compared to the initial parameters. The registered depression of the muscle contraction force testified to development of gastrocnemius muscle fatigue, accompanied by mitochondrial factor (MF) appearance in blood from femoralis vein, which, as shown by us earlier, is a marker of the mPTP opening. Injection of L-NMMA, a NOS inhibitor (2.7 mg/kg, i.a.) resulted in pronounced fall (more than 1.5 times) of the initial force parameters, in comparison with the control experiments. Under these conditions the magnitude of oxygen cost of gastrocnemius muscle work exceeded control parameters considerably. The development of gastrocnemius muscle fatigue under L-NMMA action was accompanied, as well as in the control condition by the mPTP opening. The preliminary injection of sodium nitroprusside, a NO donor (0.2 mg/kg, iv) prevented a fall of muscle contractions force and considerable inhibition of oxygen usage efficiency by gastrocnemius muscle under conditions similar to control. Furthermore, gastrocnemius muscle fatigue was not developed, and MF concentration

in blood from femoralis vein was much lower, than in the control experiments, that testified to absence of the mPTP opening. Apparently, preliminary short-term (30") electrical stimulation (8 Hz, 5 ms, 20 V) with 2' interval, created the precondition effect and raised the level of authentic NO. Under these conditions, as well as under preliminary injection of the NO donor, we did not register the marked inhibition of oxygen usage efficiency and development of gastrocnemius muscle fatigue. At the same time, MF in blood from v. femoralis was practically absent, that testify to absence of the mPTP opening. Thus, NO in physiological concentration by inhibition of mPTP opening, can prevent decrease of oxygen usage efficiency and development of the working skeletal muscle fatigue.

*O. O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Агаджанян Н.А., Багиров М.М., Березовский В.А. и др. Словарь-справочник по физиологии и патофизиологии дыхания. – К: Наук. думка, 1984. – 256 с.
2. Надточій С.М., Богуславський А.Ю., Сагач В.Ф. Вивчення стабільного фактору мітохондріального походження in vivo // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, №5. – С.25–31.
3. Сагач В.Ф., Богуславський А.Ю., Дмитрієва А.В., Надточій С.Н. Роль NO та мітохондріальної пори в регуляції кисневих режимів працюючого скелетного м'яза // Там само. – 2004. – **50**, №2. – С.19–26.
4. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Акопова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондріального фактора // Там само. – 2003. – **49**, №1. – С. 3–12.
5. Сагач В.Ф., Киндыбалюк А.М. О роли эндотелия в развитии функциональной гиперемии скелетных мышц // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1991. – **112**, № 11. – С. 453–456.
6. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Вивчення ролі оксиду азоту у змінах споживання кисню та кисневої вартості роботи серцевого м'яза // Фізіол. журн. – 2000. – **46**, №2. – С.33–38.
7. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Там само. – 2003. – **49**, №4. – С.6–12.
8. Balon T.W., Nadler J.L. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle // J. Appl. Physiol. – 1997. – **82**. – P.359–363.
9. Beresewicz A., Maczewski M., Duda M. et al. Effect of classic preconditioning and diazoxide on endothelial function and O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO generation in the post-ischemic guinea-pig heart // Cardiovasc. Res. – 2004 – **63**, № 1. – P.118–129.
10. Brookes P. S., Salinas E. P., Darley-Usmar K. et al. Concentration-dependent effect of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrom c release // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, **27**. – P.20474–20479
11. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death // Biochimie. – 2002. – **84**. – P.143–152.
12. Endo T., Imaizumi T., Tagawa T. et al. Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm // Circulat. – 1994. – **90**. – P. 2886–2890.
13. Halestrap A., Mcstay G., Clarke S. The permeability transition pore complex: another view // Biochimie. – 2002. – **84**. – P.153–166.
14. Hausenloy D.J., Yellon D.M., Duchon M.R. et al. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2004. – **109**. – P.1714–1717.
15. Koge P., Goldhaber J., Weiss J. Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death // Ibid. – 2001. – **280**. – P.H2203–H2213.
16. Loke K.E., Laycock S.K., Mital S. et al. Nitric oxide modulates mitochondrial respiration in failing human heart // Circulat. – 1999. – **100**. – P. 1291–1297.
17. Marechal G., Gailly P. Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle // Cell. Mol. Life Sci. – 1999. – **55**(8–9). – P. 1088–1102.
18. Moncada S., Erusalimsci J. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? // Natural. Reviews. Mol. Cell. Biol. – 2002. – **3**. – P.214–220.
19. Stamler J.S., Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle // Physiol. Rev. – 2001. – **81**. – №1. – P. 209–237.
20. Xie Y., Shen W., Zhao G. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure // Circulat. Res. – 1996. – **73**, № 3. – P.381–387.