

**ВПЛИВ N<sup>o</sup>-НІТРО-L-АРГІНІНУ НА ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ  
ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ МІТОХОНДРІЙ  
ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ РАБДОМІОЛІЗУ**

*Введення інгібітора NO-синтаз N<sup>o</sup>-нітро-L-аргініну запобігає активації аскорбатіндукованого пероксидного окиснення ліпідів, підвищенню активності гемоксигенази та глутатіонпероксидази, але не впливає на збільшення вмісту загального гемму в мітохондріях печінки щурів за умов рабдоміолізу. Обговорюється роль гемму та монооксиду азоту в регуляції прооксидантно-антиоксидантної системи мітохондрій печінки тварин при гліцероліндукованому рабдоміолізі.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гемоксигеназа, глутатіонпероксидаза, пероксидне окиснення ліпідів, гем, монооксид азоту, гліцерол, N<sup>o</sup>-нітро-L-аргінін.

**ВСТУП.** Рабдоміоліз – руйнування міоцитів з виходом міоглобіну в кров, що призводить до значного накопичення потужного прооксиданта (вільного гемму) в тканинах ссавців. Основним механізмом захисту від пошкоджувальних ефектів гемму є його руйнування гемоксигеназною системою, яка включає, щонайменше, дві ізоформи ферменту: конститутивну – гемоксигеназу-2 (ГО-2) й індукцибельну – ГО-1. В мітохондріях печінки присутня ГО-1, основною функцією якої, ймовірно, є регуляція в органелах вмісту вільного гемму і гемопротейнів [3], до яких належать низка компонентів дихального ланцюга та мітохондріальна NO-синтаза (mхNOS). Продукт реакції, що каталізується mхNOS, монооксид азоту (NO), бере участь у регуляції вмісту активних форм кисню (АФК) в мітохондріях [2, 5], однак роль NO в регуляції прооксидантно-антиоксидантного (ПА) потенціалу мітохондрій за умов рабдоміолізу практично не досліджено.

У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідження впливу інгібітора NO-синтаз N<sup>o</sup>-нітро-L-аргініну (L-NNA) на показники прооксидантно-антиоксидантної системи мітохондрій печінки щурів за гліцерольної моделі рабдоміолізу.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослід виконано на 49 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 180–250 г. Рабдоміоліз моделювали внутрішньом'язовою ін'єкцією 50 % водного розчину гліцеролу в дозі 1 мл/100 г маси тіла

© І. В. Нікітченко, Т. В. Бараннік, Ю. В. Нікітченко, С. Г. Алі, П. А. Каліман, 2014.

по 1/2 дози в кожний стегновий м'яз. L-NNA вводили внутрішньочеревно в дозі 3,5 мг/100 г маси тіла за 0,5 год до введення гліцеролу. Контрольній групі тварин вводили відповідний об'єм фізрозчину. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом через 2 або 24 год після ін'єкції гліцеролу. Мітохондрії отримували методом диференційного центрифугування [1]. Вміст загального гемму визначали піридингемохромним методом [7]. Гемоксигеназну (ГО) активність, рівень ТБК-активних продуктів та інтенсивність аскорбатіндукованого пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) визначали, як описано в роботі [8]. Глутатіонпероксидазну (ГПО) активність визначали спектрофотометричним методом [6]. Вміст білка визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера. Достовірність змін показників залежно від типу розподілу даних оцінювали за t-критерієм Стюдента або U-критерієм Манна-Уїтні. Достовірними вважали розбіжності з рівнем значущості  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Вміст загального гемму в мітохондріях печінки зріс на 60 % через 2 год після ін'єкції гліцеролу, що супроводжувалось підвищенням інтенсивності аскорбатіндукованого ПОЛ більш ніж у 5 разів (табл.). Через добу ці показники повернулися до контрольного рівня. Вміст ТБК-активних продуктів у досліджені терміни після введення гліцеролу не змінився. Можна припустити, що накопичення гідрофобних молекул гемму, які містять іони заліза, здатного брати участь в окисно-відновних реакціях, порушує цілісність

Таблиця – Показники прооксидантно-антиоксидантного стану мітохондрій печінки щурів після введення гліцеролу і N<sup>o</sup>-нітро-L-аргініну (M±s або Me (квартили) для ПОЛ; n=5–7)

Контроль	Гліцерол		L-NNA+гліцерол		L-NNA	
	2 год	24 год	2 год	24 год	2 год	24 год
Вміст загального гемму, нмоль/мг білка						
0,46±0,14	0,72±0,19*	0,48±0,13	0,64±0,06*	0,49±0,13	0,52±0,08	0,48±0,10
Інтенсивність аскорбатіндукованого ПОЛ, нмоль МДА/мг білка						
0,36 (0,29; 0,37)	2,02 (0,98; 2,10)*	0,57 (0,36; 0,66)	0,82 (0,41; 1,13)	0,37 (0,34; 0,44)	0,74 (0,35; 4,33)	0,27 (0,15; 0,54)
Вміст ТБК-активних продуктів, нмоль МДА/мг білка						
0,24±0,05	0,18±0,09	0,17±0,07	0,21±0,03	0,23±0,04	0,22±0,02	0,20±0,07
Гемоксигеназна активність, нмоль білірубину/хв на 1 мг білка						
0,036±0,003	0,065±0,027*	0,107±0,035*	0,040±0,005	0,052±0,007**(*)	0,039±0,007	0,035±0,006
Глутатіонпероксидазна активність, нмоль NADPH/хв на 1 мг білка						
61,8±12,7	64,2±21,6	84,1±5,8*	37,5±6,7*	59,9±15,4**	62,0±14,4	63,0±11,4

Примітки:

1. \* – p<0,05 відносно контролю.

2. \*\* – p<0,05 відносно групи "Гліцерол, 24 год".

мембран мітохондрій і структурно-функціональний стан цих органел.

Як антиоксидантну ланку мітохондрій досліджували гемоксигеназну та глутатіонпероксидазну активність. Встановлено, що ГО активність збільшилась на 80 % уже в перші години після ін'єкції гліцеролу, а через добу активність ферменту перевищувала контрольний рівень у 3 рази (табл.). Відомо, що у внутрішній мембрані мітохондрій локалізована індукцйбельна форма ферменту, ГО-1 [3], експресія гена якої контролюється концентрацією вільного гемму [2], тому зміни ГО активності можуть бути пов'язані саме з накопиченням гемму в органелах.

ГПО активність мітохондрій не змінювалась в перші години після введення гліцеролу, а через добу підвищилася на 40 %. В мітохондріях печінки локалізовані дві селенозалежні ізоформи ферменту: ГПО-1 і ГПО-4, експресія генів яких підвищується АФК та монооксидом азоту [4]. Відповідно до даних роботи [5], в мітохондріях нирок щурів за гліцероліндукованого рабдоміолізу посилюється продукування NO, що корелює зі збільшенням рівня продуктів ПОЛ в органелах. Відомо, що утворений NO в результаті модулювання активності мхNOS інгібує дихання мітохондрій, що призводить до відновлення компонентів редокс-ланцюга, і, як наслідок, збільшується утворення АФК та азоту: O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> й пероксинітриту [2].

Для з'ясування ролі монооксиду азоту у встановлених змінах ПА балансу був використаний неспецифічний конкурентний інгібітор NO-синтази N<sup>o</sup>-нітро-L-аргінін. Встановлено, що попереднє введення L-NNA не впливало на динаміку вмісту загального гемму в мітохондріях печінки після ін'єкції гліцеролу (табл.). Водночас введення L-NNA запобігало збільшенню інтенсивності аскорбатіндукованого ПОЛ, що спо-

стерігали через 2 год після ін'єкції гліцеролу. Вміст ТБК-активних продуктів у мітохондріях печінки не змінювався після сумісного введення L-NNA та гліцеролу (табл.).

Попереднє введення інгібітора NO-синтази спричиняло зниження ГПО активності через 2 год після ін'єкції гліцеролу, а через добу запобігало підвищенню активності ферменту (табл.), що узгоджується з даними літератури про участь NO в активації експресії генів ГПО [4]. За умов сумісного введення L-NNA та гліцеролу повністю блокувалось підвищення ГО активності в перші години рабдоміолізу, а через добу активність ферменту зросла лише на 44 %. Ймовірно, зміни в динаміці ГО активності пов'язані зі зниженням вмісту NO в органелах. Відомо, що оксид азоту може збільшувати синтез ГО-1 за рахунок активації експресії гена і стабілізації мРНК ізоферменту, а також NO може посилювати індукуючий ефект гемму на експресію гена ГО-1 [2, 9]. Крім того, швидкість транслокації до мітохондрій ГО-1, яка синтезується на цитоплазматичних рибосомах, очевидно, залежить від інтенсивності генерування мітохондріями АФК [3]. Отже, можна припустити, що за умов інгібування утворення оксиду азоту причиною зменшення ГО активності є зниження синтезу ГО-1 de novo та/або транслокації ферменту до мітохондрій.

**ВИСНОВКИ.** Встановлені в роботі зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу, очевидно, зумовлені збільшенням у мітохондріях вмісту вільного гемму. Як свідчать отримані дані, монооксид азоту відіграє важливу роль у регуляції прооксидантно-антиоксидантної системи мітохондрій печінки щурів, особливо в регуляції активності ключового ферменту деградації гемму, гемоксигенази.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лемешко В. В. Система микросомального окисления при развитии и старении организма / В. В. Лемешко // Биохимия. – 1980. – **45**, № 11. – С. 1964–1969.
2. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др.]. – М. : Фирма “Слово”, 2006. – 556 с.
3. NO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism / D. P. Converso, C. Taille, M. C. Carreras [et al.] // The FASEB Journal. – 2006. – **20**. – P. 482–492.
4. Induction of glutathione peroxidase in response to inactivation by nitric oxide / K. Dobashi, K. Asayama, T. Nakane [et al.] // Free Radic. Res. – 2001. – **35**, № 3. – P. 319–327.
5. Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria / E. Y. Plotnikov, A. A. Chupyrkina, I. B. Pevzner [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – **1792**, № 8. – P. 796–803.
6. Paglia D. E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / D. E. Paglia, W. N. Valentine // J. Lab. Clin. Med. – 1967. – **70**. – P. 158–169.
7. Paul K.G. The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen) / K. G. Paul, H. Theorell, A. Akeson // J. Acta Chem. Scand. – 1953. – **7**, № 9. – P. 1284–1287.
8. Regulation of heme oxygenase activity in rat liver during oxidative stress induced by cobalt chloride and mercury chloride / P. A. Kaliman, I. V. Nikitchenko, O. A. Sokol [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2001. – **66**, № 1. – P. 77–82.
9. The interaction of nitric oxide with distinct hemoglobins differentially amplifies endothelial heme uptake and heme oxygenase-1 expression / R. Foresti, S. Bains, F. Sulc [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – **317**. – P. 1125–1133.

**И. В. Никитченко, Т. В. Баранник, Ю. В. Никитченко, С. Г. Али, П. А. Калиман**  
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. Н. КАРАЗИНА

## ВЛИЯНИЕ N<sup>o</sup>-НИТРО-L-АРГИНИНА НА ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ РАБДОМИОЛИЗЕ

### Резюме

*Введение ингибитора NO-синтазы N<sup>o</sup>-нитро-L-аргинина предотвращает активацию аскорбатиндуцированного пероксидного окисления липидов, повышение активности гемоксигеназы и глутатионпероксидазы, но не влияет на увеличение содержания общего гема в митохондриях печени крыс при рабдомиолизе. Обсуждается роль гема и монооксида азота в регуляции прооксидантно-антиоксидантной системы митохондрий печени животных при глицеролиндуцированном рабдомиолизе.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гемоксигеназа, глутатионпероксидаза, пероксидное окисление липидов, гем, монооксид азота, глицерол, N<sup>o</sup>-нитро-L-аргинин.

**I. V. Nikitchenko, T. V. Barannik, Yu. V. Nikitchenko, S. H. Ali, P. A. Kaliman**  
V. N. KARAZIN KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY

## EFFECT OF N<sup>o</sup>-NITRO-L-ARGININE ON THE ALTERATIONS OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM INDEXES IN RATS LIVER MITOCHONDRIA UNDER RHABDOMYOLYSIS

### Summary

*The injection of NO-synthase inhibitor N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine prevents ascorbate-induced LPO activation, the increase of heme oxygenase and glutathione peroxidase activity, but doesn't affect the increase of total heme content in rat liver mitochondria under rhabdomyolysis. The role of heme and nitrogen monoxide in the regulation of prooxidant-antioxidant system in rat liver mitochondria under glycerol-induced rhabdomyolysis is discussed.*

**KEY WORDS:** heme oxygenase, glutathione peroxidase, LPO, heme, nitrogen monoxide, glycerol, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine.

Отримано 10.07.14

**Адреса для листування:** І. В. Нікітченко, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, площа Свободи, 4, Харків, 61022, Україна.