

На правах рукописи



Марсянова Юлия Александровна

**Роль оксида азота (II) в функционировании митохондрий
семенных пузырьков и эпидидимиса крыс при моделировании
нормобарической гипоксии**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Рязань – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Звягина Валентина Ивановна,**
доктор медицинских наук, доцент, доцент кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты: **Котова Юлия Александровна,**
доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Тимошин Александр Анатольевич,
доктор биологических наук, и.о. руководителя лаборатории физико-химических методов исследования Института экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « _____ » _____ 2025 года в _____ на заседании Диссертационного совета 24.1.241.02 при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14 и на сайте организации <https://ion.ru>.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Шумакова А.А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

На сегодняшний день в мире около 17,5% пар являются бездетными по причине бесплодия, в 50% случаев причиной является мужская инфертильность. В мужской репродуктивной системе оксид азота (II) (NO) участвует в синтезе, секреции и подвижности сперматозоидов, в акросомной реакции (Meiser, 2003), регулирует сократительную способность семенных пузырьков, брачное поведение и гормональный статус (Moustafa, 2021). Молекулярный механизм эффектов NO при адаптации к гипоксии активно рассматривается в современной исследовательской практике (Галагудза, 2023; Banerjee, 2022; Levenez, 2022; Miranda, 2021). В митохондриях NO понижает активность цитохромоксидазы (Hagen, 2003), способствует проявлению транскрипционного ответа на дефицит кислорода с помощью фактора, индуцируемого гипоксией (HIF) (Wierońska, 2021). Однако в литературе встречаются экспериментальные данные о положительном влиянии дефицита NO на мужскую фертильность (Ibukun, 2015). Подобные противоречия вызывают необходимость рассмотрения вопроса использования доноров и ингибиторов синтеза NO для возможного решения проблемы бесплодия.

К настоящему времени сформировано представление о регуляции метаболизма при кислорододефиците в основных кислородчувствительных тканях млекопитающих: головном мозге, легком, мышцах, почках (Воронков, 2018; Куликов, 2015; Лукьянова, 2018; Русаков, 2006; Chang, 2019; Farhat, 2021; Liu, 2020; Burtscher, 2021; Shu, 2019; Wierońska, 2021). Так, каноническим путём адаптации считается переключение энергетического метаболизма на анаэробный тип, с преобладанием гликолиза над окислительным фосфорилированием.

Развитие нарушений метаболизма при гипоксии тесно сопряжено с изменением функционирования митохондрий и формированием вторичной митохондриальной дисфункции (Лукьянова, 2003, 2019), что является как маркером патологического состояния, так и ключевым звеном патогенеза. Сигнальная, регуляторная, энергетическая, амфиболическая функции этих органелл направлены на эффективное использование внутриклеточных ресурсов, как в норме, так и в условиях метаболического стресса. Изучение механизмов адаптационного ответа митохондрий является ключевой задачей современных фундаментальных и клинических исследований, реализуемых в рамках «Стратегии научно-технологического развития РФ», утверждённой указом Президента РФ №642 от 1 декабря 2016 г. и №145 от 28 февраля 2024 г.

Таким образом, высокая степень значимости оксида азота (II) для мужской фертильности и при адаптации к гипоксии предполагает возможную связь этих процессов, что делает актуальным изучение роли NO в митохондриальных путях регуляции при дефиците кислорода в тканях репродуктивной системы.

Степень разработанности темы

Роль оксида азота (II) в регуляции функций митохондрий различных тканей, в частности, эпидидимиса, дефицит NO и эффекты индукции его синтеза активно изучаются современными исследователями, в том числе на кафедре биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ (Звягина, 2016, 2022; Галагудза, 2023; Быков, 2023; Song, 2021; Janaszak-Jasiecka, 2021; Shemarova, 2021).

Установлено негативное влияние L-NAME-индуцированного дефицита NO на состояние митохондрий придатка яичка (Звягина, 2015), и подтверждено протективное действие предшественника NO L-аргинина в условиях метиониновой нагрузки (Звягина, 2022), а также на примере других тканей при митохондриальных заболеваниях (Korbecki, 2012), дисфункции эндотелия (Zhao, 2018), и церебральной гипоксии (Abdel Baky, 2010). Определена роль NO в качестве регулятора в патогенезе больных бронхиальной астмой (Шаханов, 2017) и подтверждено развитие дисфункции митохондрий при дефиците оксида азота (II) в тканях лёгких на моделях лабораторных животных (Медведев, 2017).

Развитие митохондриальной дисфункции также было подтверждено исследованиями пациентов, страдавших от болезней, сопряжённых с нарушением кислородообеспечения

организма (Бельских, 2018, 2020). Единство механизмов тканевого дыхания является ключом к пониманию общих закономерностей регуляции метаболизма, однако, поскольку эпидидимис и семенные пузырьки можно отнести к тканям со средней чувствительностью к гипоксии (Mohyeldin, 2010), возникает вопрос: насколько применимы к ним классические представления о механизмах приспособления к кислорододефициту.

Моделирование состояния острой гипоксии для изучения возможных механизмов адаптации и патогенеза в тканях мужской половой системы показало развитие оксидативного стресса (Марсянова, 2019), что само по себе является неблагоприятным фактором для созревания сперматозоидов (Wu, 2020), но оказалось малоэффективным для имитации глубоких и устойчивых изменений метаболизма митохондрий (Карасева, 2019). В другом исследовании было показано, что сукцинат способствует снижению свободно-радикальных процессов (Кяримов, 2021), что, в совокупности с литературными данными о его сигнальной и регуляторной роли, определило этот субстрат, в качестве возможного антигипоксанта фактора для дальнейшего исследования.

Кроме того, установлено, что состояние, схожее с гипоксией, может развиваться в клетках даже в присутствии кислорода путём стимуляции HIF-опосредованного механизма адаптации сукцинатом (Мыльников, 2018; Лукьянова, 2019; Li, 2018), который также вызывает неоваскуляризацию (Sapieha, 2008), гемопоз (Deen, 2011), продукцию и NO (Gilissen, 2016) и сукцинирование белков митохондрий. По-видимому, сукцинат и оксид азота (II) действуют, как синергисты, вызывая дилатацию сосудов, что облегчает доступ кислорода к тканям (Leite, 2016), но механизм их взаимного влияния, в частности, на метаболизм митохондрий, остаётся малоизученным.

Таким образом, предпосылкой к данному исследованию послужили ранее установленные свидетельства взаимосвязи между состоянием гипоксии, регуляцией путей метаболизма оксидом азота (II) и сукцинатом.

Цель исследования

Оценить состояние и механизмы трансформации митохондриальной активности в условиях изменённой генерации оксида азота (II) путём введения ингибитора или субстрата NO-синтазы при моделировании нормобарической гипоксии и её коррекции сукцинатом.

Задачи исследования:

1. Исследовать изменения биохимических показателей метаболизма, связанных с функциями митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса крыс, при моделировании нормобарической гипоксии изолированно и на фоне L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II).

2. Определить степень карбонилирования белков митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса крыс, при моделировании нормобарической гипоксии изолированно и на фоне L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II).

3. Оценить влияние оксида азота (II) на развитие изменений биохимических показателей метаболизма, связанных с функциями митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса крыс, при моделировании нормобарической гипоксии и в условиях введения L-аргинина, как субстрата для синтеза NO.

4. Оценить влияние оксида азота (II) на степень карбонилирования белков митохондрий исследуемых органов, при моделировании нормобарической гипоксии и в условиях назначения L-аргинина, как субстрата для синтеза NO.

5. Изучить эффекты назначения сукцината, оказываемые им в качестве антигипоксанта фактора на биохимические показатели метаболизма, связанные с функциями митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса крыс, при нормобарической гипоксии и в условиях изменённого синтеза оксида азота (II).

6. Изучить эффекты, вызванные назначением сукцината в качестве антигипоксанта фактора, на степень карбонилирования белков митохондрий исследуемых органов при нормобарической гипоксии и в условиях изменённого синтеза оксида азота (II).

7. Проанализировать зависимость уровня гонадостероидов в плазме крови и биохимических маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса крыс при изменённом синтезе оксида азота (II) и нормобарической гипоксии.

Методология и методы исследования

Работа с животными осуществлялась на базе вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, лабораторные исследования проводились на базе кафедры биологической химии РязГМУ. Определение концентрации общего белка в гомогенатах тканей проводили методом Лоури диагностическим набором КлиниТест-ОБ (НПЦ «Эко-сервис», Россия); HIF1 α с помощью ИФА набора (ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 α), Cloud-Clone Corp., США); метаболитов оксида азота (II) по способности восстанавливать хлорид ванадия; молочной кислоты энзиматическим методом реакцией Триндера набором для определения концентрации молочной кислоты в биологических жидкостях (Ольвекс Диагностикум, Россия); сукцината диагностическим набором Succinate Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich Corporation, США); фруктозы по реакции Селиванова; тестостерона и эстрадиола с помощью наборов «СтероидИФА-тестостерон» и «СтероидИФА-эстрадиол» (Алкор Био, РФ). Комплексную оценку карбонилирования белков проводили по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой, расчёты производили с помощью программы для ЭВМ. Определение активности лактатдегидрогеназы проводили оптимизированным кинетическим методом с помощью набора ЛДГ-Ольвекс (Ольвекс Диагностикум, Россия); активности сукцинатдегидрогеназы спектрофотометрическим методом по степени восстановления феррицианида калия; активности α -глюкозидазы набором α -Glucosidase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich Corporation, США); активности цитохромоксидазы по изменению оптической плотности раствора цитохрома с при окислении в присутствии фермента; активности H⁺/АТФ-синтазы по скорости гидролиза АТФ; активности супероксиддисмутазы по скорости ингибирования реакции аутоокисления кверцетина. Определение фракций лактатдегидрогеназы методом электрофореза в полиакриламидном геле (CN-PAGE) с последующей детекцией *in situ* по ферментативной активности лактатдегидрогеназы.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования

В рамках исследовательской работы усовершенствована методика определения активности цитохромоксидазы, разработан и запатентован способ моделирования нормобарической хронической гипоксии, отличающиеся простотой исполнения, хорошей воспроизводимостью и доступностью реактивов и оборудования.

Впервые произведена оценка скорости достижения критических значений содержания газов при возвратном дыхании, при этом установлено уменьшение времени достижения критических значений уровня газов во вдыхаемом воздухе, снижение активности цитохромоксидазы и уровня HIF1 α , ассоциированного с митохондриями семенных пузырьков и эпидидимиса.

Получены приоритетные данные, подтверждающие гипоксия-подобный эффект донора NO L-аргинина и участие оксида азота (II) в активации анаэробного метаболизма.

Произведена комплексная оценка окислительной модификации белков митохондрий в условиях гипоксии, в результате чего доказаны: антиоксидантные эффекты L-аргинина на уровне регуляции активности супероксиддисмутазы; способность оксида азота (II) препятствовать металл-зависимому карбонилированию белков; высокая устойчивость к окислительному стрессу хвоста эпидидимиса по сравнению с головкой придатка яичка.

Впервые установлено изменение изоферментного спектра лактатдегидрогеназы: понижение активности способствующих утилизации лактата ЛДГх и ЛДГ1 при экспериментальном дефиците NO и повышение при введении животным L-аргинина, что указывает на адаптационную роль оксида азота (II) в условиях гипоксии/реоксигенация, а также свидетельствует о повышении роли лактата как источника энергии и усилении лактатного шунта.

Получены данные, доказывающие, что сукцинат реализует свои функции посредством NO, дополняющие современные представления о развитии окислительного стресса при

гипоксии, и раскрывающие механизмы про- и антиоксидантного влияния оксида азота (II), что может быть использовано для разработки лекарственных препаратов, схем лечения и профилактики мужского бесплодия, а также для совершенствования вспомогательных репродуктивных технологий.

Установлены корреляционные связи между биохимическими показателями плазмы крови и маркерами митохондрий, зависимость изменения активности α -глюкозидазы головки эпидидимиса от уровня эстрадиола плазмы крови и содержания тестостерона от модуляции синтеза NO: повышение при экспериментальном дефиците оксида азота (II) и снижение при индукции синтеза NO L-аргинином, что может стать основой перехода к персонализированной, предиктивной и профилактической медицине.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В условиях гипоксии оксид азота (II) обеспечивает снижение активности цитохромоксидазы, поддерживая анаэробный метаболизм и альтернативные пути использования кислорода, такие как гидроксилирование транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией, препятствуя развитию негативных последствий кислорододефицита: лактоацидоза и гипознергетического состояния.

2. Степень развития окислительного стресса при нормобарической хронической гипоксии зависит от биодоступности оксида азота (II): в условиях кислорододефицита снижение уровня NO ассоциировано с повышением активности супероксиддисмутазы и увеличением скорости накопления продуктов спонтанной модификации, обусловленной преимущественно металл-зависимым окислением белков, что выражается в снижении резервно-адаптационного потенциала.

3. Адаптация к гипоксии в условиях индукции синтеза NO реализуется через гипоксия-подобный эффект L-аргинина, проявляющего антиоксидантные свойства за счёт повышения потенциала антиоксидантной системы защиты клеток и способности оксида азота (II) препятствовать металл-зависимому окислению белков митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса при гипоксии.

4. Эффекты получения животными сукцината выражаются в увеличении использования его в качестве энергетического субстрата, стабилизации активности ферментов дыхательной цепи при кислорододефиците и L-NAME-опосредованном дефиците оксида азота (II), а в условиях гипоксии и индуцирования синтеза NO L-аргинином – в повышении внутриклеточной утилизации лактата, что препятствует развитию ацидоза.

5. Наиболее эффективно антиоксидантные и антигипоксантные свойства сукцината в семенных пузырьках и эпидидимисе проявляются в условиях физиологического синтеза оксида азота (II), менее выражено – при индукции синтеза NO естественным субстратом L-аргинином, а при моделировании дефицита NO преобладают прооксидантные свойства.

6. Гипоксическое состояние, вызванное кислорододефицитом или применением препаратов, обладающих гипоксия-подобным эффектом (L-аргинина или сукцината), сопровождается снижением уровня тестостерона и секреторной способности семенных пузырьков.

Достоверность и апробация научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается корректным использованием современных экспериментальных методов проведения исследования, методов обработки и статистического анализа полученных данных. Логическое обоснование результатов и выводы основаны на известных достижениях фундаментальных и прикладных научных дисциплин, сопряжённых с предметом исследования диссертации.

Результаты исследования доложены на конференциях различного уровня: Межвузовская научно-практическая on-line конференция молодых учёных «Итоги и перспективы биохимических исследований», Воронеж, Рязань, 30 января 2020 г.; Ежегодная научная конференция РязГМУ им. акад. И.П. Павлова к 70-летию основания ВУЗа на Рязанской земле, г. Рязань, 18 декабря 2020 г.; XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», ФГБОУ ВО МГУ им. М.В.

Ломоносова, г. Москва, 12 апреля 2021 г.; XXII Тихоокеанская научно-практическая конференция студентов и молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины», г. Владивосток, 12-16 апреля 2021 г.; LXXXII Ежегодная итоговая научно-практическая конференция студентов и молодых учёных с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2021», г. Санкт-Петербург, 21 апреля 2021 г.; Всероссийская научно-практическая конференция «Биохимия – основа жизни», г. Уфа, 17 сентября 2021 г.; Международная научно-практическая конференция (69-годовая) ГОУ ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Достижения и проблемы фундаментальной науки и клинической медицины», г. Душанбе, 17 ноября 2021 г.; Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицины и высшего медицинского образования», г. Бишкек, 22-24 ноября 2021 г.; VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвящённая году науки и технологий «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации», г. Электрогорск, 26 ноября 2021 г.; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева», г. Рязань, 26-27 января 2022 г.; Российская научно-практическая конференция «Зубаировские чтения: новое в коагулологии» «Медицинская биохимия: достижения и перспективы», г. Казань, 10-11 ноября 2023 г.

Публикации по теме исследования

По теме исследования опубликовано 16 печатных работ, в том числе 1 патент, 2 статьи в журналах перечня ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 2 статьи в изданиях, индексируемых в международной цитатно-аналитической базе данных Scopus.

Личный вклад автора

Литературный поиск, работа с лабораторными животными и полученным биоматериалом, обработка полученных данных, в том числе статистический анализ, проводились автором самостоятельно. Постановка цели и задач, разработка дизайна исследования, интерпретация результатов и подготовка научных публикаций осуществлялись совместно с научным руководителем.

Сведения о внедрении

Полученные при выполнении диссертационной работы результаты внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России: разработан информационный стенд «Биологические мембраны»; курс мультимедийных материалов «Метаболизм аргинина, метионина, карнитина и сукцината»; лабораторные работы; а так же в работу вивария на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России: способ моделирования нормобарической хронической гипоксии (Патент № 2739675 С1 РФ) для выполнения НИР другими исследователями.

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждений, заключения и выводов, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки тем, содержит список условных сокращений и список литературы. Объём работы составляет 216 страниц машинописного текста, включает 65 рисунков и 27 таблиц. Список литературы охватывает 287 источников, 81 из них российских и 206 зарубежных.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 120 половозрелых самцах крыс Wistar: 15 групп, n=8. Содержание животных и работа с ними были одобрены на заседании комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол №16, 2018 г.) и осуществлялись в соответствии с этическими нормами и принципами гуманного обращения с животными.

Основные серии экспериментов сопряжены с моделированием нормобарической хронической гипоксии (НХГ) в условиях изменённой генерации оксида азота (II) и коррекции состояния с помощью сукцината. Моделирование НХГ проводили с помощью гермокамеры, подключённой к многоканальному газоанализатору. Животные содержались в камере по одному до тех пор, пока уровень кислорода не снижался до 10%, в среднем для этого требовалось 16 (± 2) минут. Сеансы проводили один раз в день ежедневно в течение 14 дней. Гипоксия моделировалась отдельно и в сочетании с препаратами: для моделирования дефицита NO применяли ингибитор NO-синтазы метиловый эфир N(ω)-нитро-L-аргинина (7 дней: с 8 по 14 день НХГ) (**L-NAME+НХГ**); для индукции синтеза NO – L-аргинин (10 дней: с 5 по 14 день НХГ) (**L-Arg+НХГ**); в качестве модулятора гипоксии – сукцинат (14 дней) (**Сук+НХГ**). Также были проанализированы взаимодействия сукцината и ингибитора NO-синтазы (**Сук+L-NAME**), сукцината и аргинина (**Сук+L-Arg**), а также сочетанное влияние этих факторов при гипоксии (**Сук+L-NAME+НХГ** и **Сук+L-Arg+НХГ**).

В качестве исследуемого биоматериала были использованы плазма крови, секрет семенных пузырьков, митохондриальная и безмитохондриальная фракции семенных пузырьков, головки и хвоста придатка яичка. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка, непараметрических U-критерия Манна-Уитни и T-критерия Уилкоксона, критерия ранговой корреляции Спирмена и шкалы Чеддока, а также применяли поправку Бонферрони.

Изменение биохимических показателей при нормобарической хронической гипоксии

На протяжении всего эксперимента по моделированию НХГ фиксировали снижение уровня кислорода и увеличение уровня углекислого газа в гермокамере. На основании этих данных рассчитывали время достижения критических значений уровней газов во вдыхаемом воздухе – $t(O_2)$ и $t(CO_2)$. Сравнение $t(O_2)$ и $t(CO_2)$ между первым и 14 днём НХГ показало, что животным требовалось статистически значимо меньше времени для достижения критических значений содержания газов к последнему дню эксперимента (Рисунок 1).

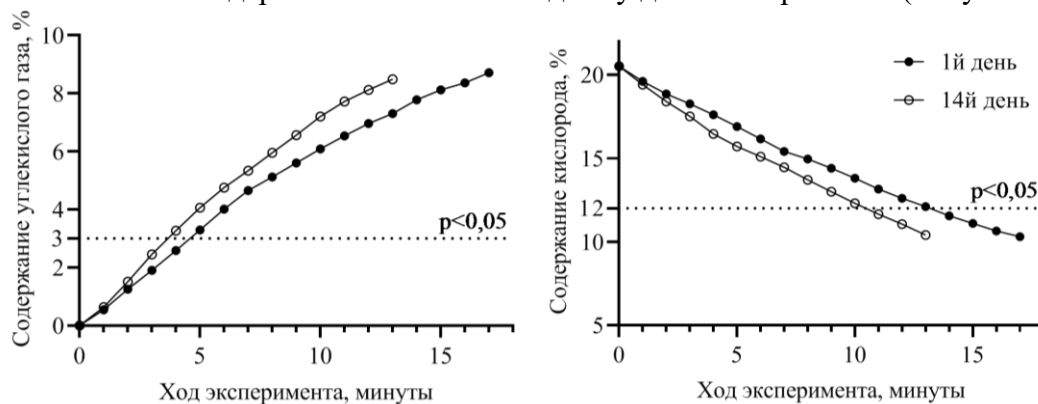


Рисунок 1 – Изменение содержания углекислого газа и кислорода в ходе эксперимента по моделированию нормобарической хронической гипоксии. *Примечания – пунктиром отмечены критические значения содержания газов – 3% для CO_2 и 12% для O_2*

При моделировании нормобарической хронической гипоксии отмечалось достоверное снижение количества HIF1 α , связанного с митохондриями семенных пузырьков, относительно состояния нормоксии, в хвосте эпидидимиса наблюдалось понижение в митохондриальной фракции и повышение в цитоплазматической, что привело к уменьшению соотношения HIF1 α МФ/ЦФ (Таблица 1). В головке придатка яичка достоверных изменений не выявлено.

В митохондриях семенных пузырьков и хвоста эпидидимиса наблюдалось достоверное снижение концентрации метаболитов оксида азота (II) у животных, подвергшихся НХГ, относительно группы контроля на 26% ($p=0,0028$) и 22% ($p=0,01$) соответственно. Статистически значимых отличий в изменении активности АТФ-синтазы и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) при моделировании НХГ выявлено не было. Достоверно

снижалась активность цитохромоксидазы (ЦО) и концентрация сукцината в семенных пузырьках на 77% ($p=0,0006$) и 74% ($p=0,007$), в головке эпидидимиса на 61% ($p=0,007$) и 30% ($p=0,004$), в хвосте эпидидимиса на 56% ($p=0,03$) и 29% ($p=0,03$).

Таблица 1 – Количество HIF1 α в митохондриальной и цитоплазматической фракциях при моделировании нормобарической хронической гипоксии, в нг/мг белка

Группы	HIF1 α МФ	HIF1 α ЦФ	Соотношение HIF1 α МФ / ЦФ
Семенные пузырьки			
Группа 3: НО	25,15 [20,59; 35,18]	4,39 [3,94; 4,97]	7,98 [3,87; 9,12]
Группа 4: НХГ	14,84 [11,57; 19,94] $p_{3-4}=0,024^*\downarrow$	2,99 [2,88; 4,29] $p_{3-4}=0,16$	4,66 [3,38; 5,7] $p_{3-4}=0,083$
Хвост эпидидимиса			
Группа 3: НО	20,53 [19,01; 23,02]	2,47 [2,35; 3,01]	7,79 [5,98; 9,27]
Группа 4: НХГ	12,83 [11,11; 13,65] $p_{3-4}=0,01^*\downarrow$	4,3 [3,91; 4,62] $p_{3-4}=0,014^*\uparrow$	2,86 [2,42; 3,37] $p_{3-4}=0,0039^*\downarrow$

Примечания – НО – нормоксия, контроль к группе 4; НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; МФ – митохондриальная фракция; ЦФ – цитоплазматическая фракция

Для оценки влияния гипоксии на энергетический метаболизм проводили определение общей активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в митохондриальной и цитоплазматической фракции (МФ и ЦФ соответственно), а также сравнивали распределение изоферментов по фракциям.

Результаты показали, что моделирование НХГ привело к повышению доли ЛДГ1 в семенных пузырьках без изменений общей активности фермента (Рисунок 2), а в тканях эпидидимиса – на фоне понижения этого показателя.

При этом отмечалось повышение доли фракции ЛДГх в хвосте придатка яичка только в митохондриях на 128 % ($p=0,0009$), а в головке – только в цитоплазме на 51% ($p=0,0009$).

Содержание лактата в семенных пузырьках при моделировании НХГ менялось разнонаправленно: понижение в митохондриях на 70% ($p=0,003$), но повышение в цитоплазме на 121% ($p=0,008$). В то же время в эпидидимисе отмечалось понижение этого показателя только в митохондриях проксимального отдела с 5,65 [4,38; 7,47] до 2,64 [2,23; 3,03] ($p=0,0009$). Возможно, изменение баланса фракций изоферментов при моделировании гипоксии обусловлено необходимостью утилизировать лактат, который в больших количествах образуется при анаэробном гликолизе, но при реоксигенации может быть донором протонов и пирувата, и, таким образом, служить источником энергии.

Изменение биохимических показателей при нормобарической хронической гипоксии и моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II)

При моделировании L-NAME-опосредованного дефицита NO на фоне НХГ отмечалось достоверное снижение метаболитов оксида азота (II) в митохондриях семенных

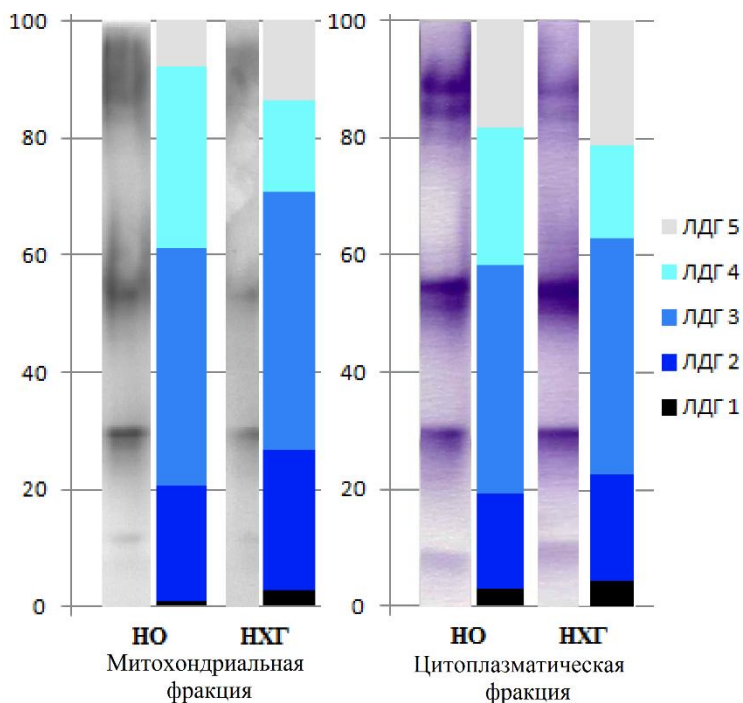


Рисунок 2 – Изоферментный спектр ЛДГ семенных пузырьков при моделировании нормобарической хронической гипоксии (НХГ) по сравнению с нормоксией (НО)

пузырьков относительно группы животных, подвергшихся воздействию только гипоксии. В эпидидимисе наблюдалось статистически значимое повышение этого показателя в серии L-NAME+НХГ относительно животных, получавших только L-NAME (Рисунок 3). Также наблюдалось повышение активности ЦО и АТФ-синтазы в хвосте эпидидимиса относительно животных, получавших только L-NAME (Рисунок 4).

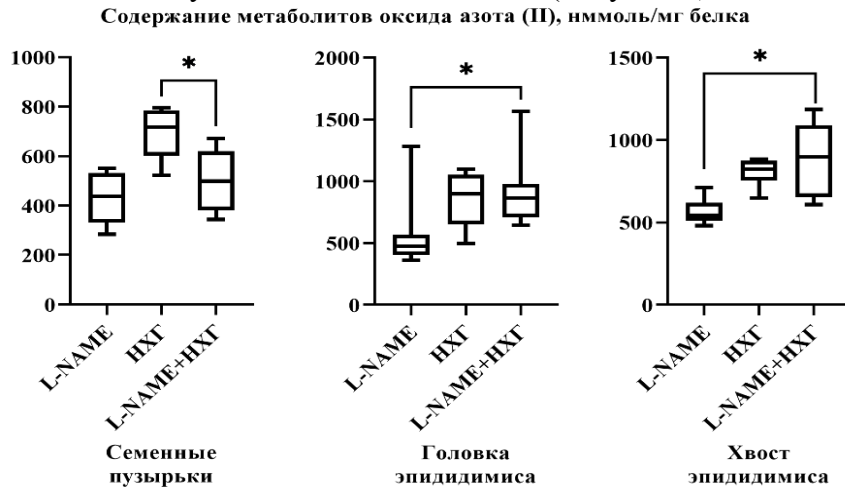


Рисунок 3 – Содержание NO_x в митохондриях при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO. *Примечания* – здесь и далее по тексту * – показаны только статистически значимые отличия между сравниваемыми группами

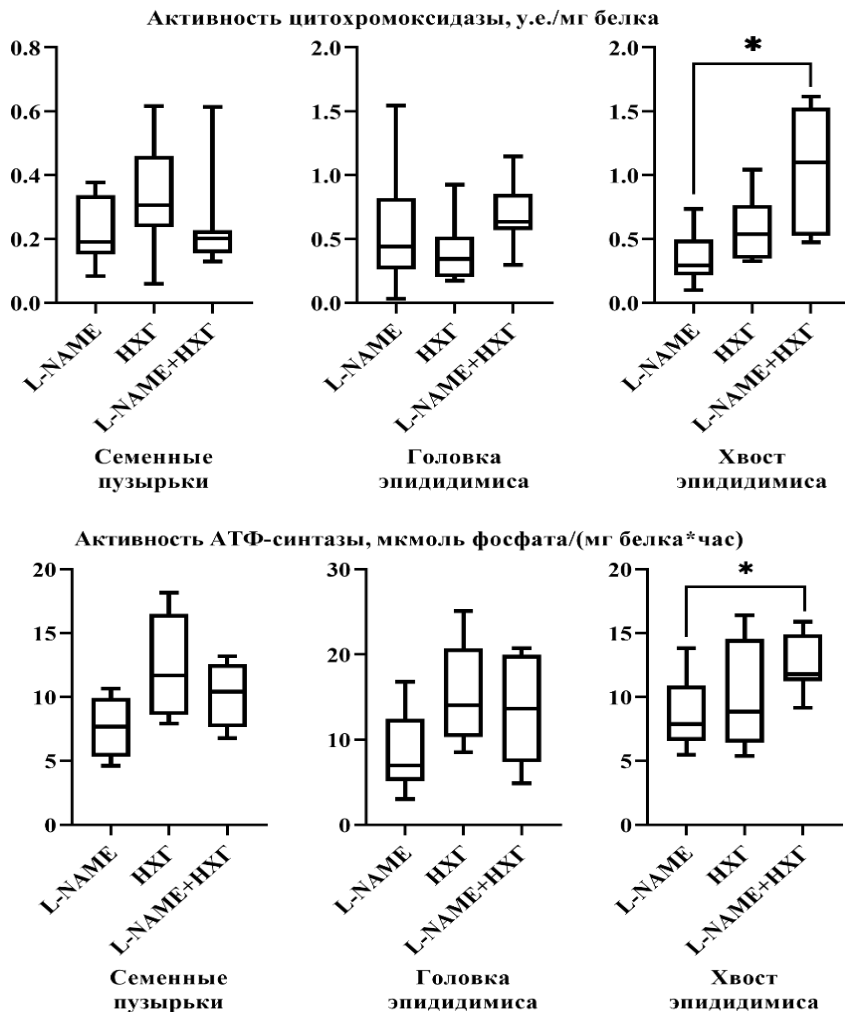


Рисунок 4 – Активность цитохромоксидазы и АТФ-синтазы при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

При сочетанном воздействии НХГ и L-NAME отмечалось повышение активности СДГ в семенных пузырьках относительно серии L-NAME и в хвосте эпидидимиса относительно серии НХГ (Рисунок 5). Тенденция повышение отмечалось и в содержании сукцината во всех тканях относительно серии L-NAME, но в семенных пузырьках уровень метаболита был снижен относительно серии НХГ (Рисунок 5).

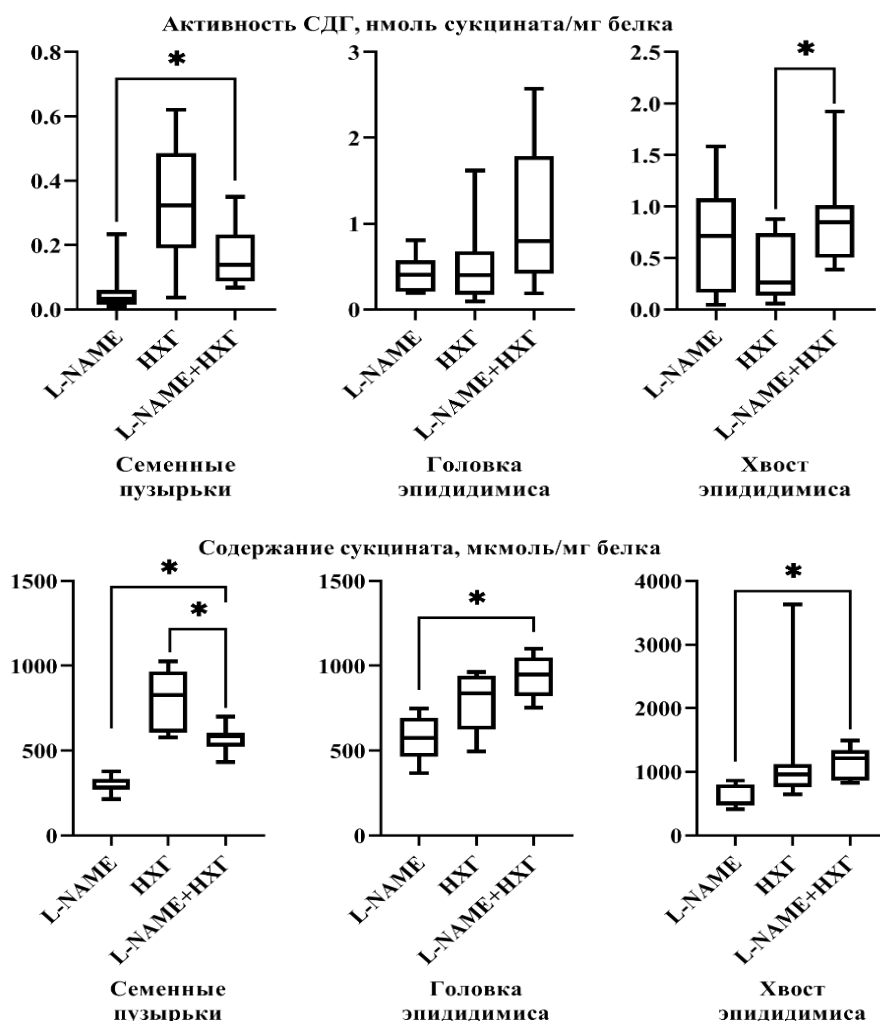


Рисунок 5 – Активность сукцинатдегидрогеназы и содержание сукцината в митохондриях при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

При моделировании гипоксии на фоне экспериментального дефицита NO концентрация лактата увеличивалась в митохондриях семенных пузырьков и цитоплазме хвоста придатка яичка (Таблица 2).

Таблица 2 – Содержание лактата в митохондриальной и цитоплазматической фракциях семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO, в мкмоль/мг белка

Группы	Митохондриальная фракция	Цитоплазматическая фракция
Семенные пузырьки		
НХГ (4)	1,76 [1,41; 1,96]	1,66 [1,2; 1,99]
L-NAME+НХГ (7)	5,28 [3,02; 7,23] $p_{4-7}=0,01^*\uparrow$	1,08 [0,89; 1,17] $p_{4-7}=0,07$
Хвост эпидидимиса		
НХГ (4)	4,38 [2,75; 6,55]	1,6 [1,58; 1,65]
L-NAME+НХГ (7)	6,88 [3,51; 10,17] $p_{4-7}=0,37$	3,31 [2,64; 3,82] $p_{4-7}=0,0019^*\uparrow$

Совместное действие L-NAME и НХГ вызвало понижение общей активности ЛДГ и повышение доли ЛДГ1 МФ в семенных пузырьках, статистически значимо отличающееся от группы животных, подвергшихся только гипоксии, достоверное повышение ЛДГ1 ЦФ относительно обоих вариантов контроля; в головке эпидидимиса – увеличение общей активности фермента, понижение ЛДГ1 и ЛДГх ЦФ, в хвосте эпидидимиса – снижение обеих фракций ЛДГх относительно контроля (Таблица 3).

Таблица 3 – Общая активность лактатдегидрогеназы в митохондриальной и цитоплазматической фракциях семенных пузырьков и эпидидимиса, в у.е./мг белка, и содержание некоторых изоформ (ЛДГ1 и ЛДГх), в % от общей активности, при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

Группы	Митохондриальная фракция			Цитоплазматическая фракция		
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх
Семенные пузырьки						
НХГ (4)	1124 [1003; 1379]	2,92 [2,66; 3,23]		1272 [1224; 2550]		3,89 [3,73; 4,11]
L-NAME+НХГ (7)	373 [221; 676] p ₄₋₇ =0,006*↓	5,47 [4,63; 5,92] p ₄₋₇ =0,014*↑		1638 [1541; 1776] p ₄₋₇ =0,43		4,68 [4,39; 4,9] p ₄₋₇ =0,014*↑
Группы	Митохондриальная фракция			Цитоплазматическая фракция		
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх
Головка эпидидимиса						
НХГ (4)	804 [709; 977]	2,22 [1,83; 2,6]	14,83 [12,65; 17,01]	3088 [2247; 3724]	2,08 [1,81; 2,34]	13,57 [13,09; 13,8]
L-NAME+НХГ (7)	3093 [2174; 4039] p ₄₋₇ =0,003*↑	1,32 [1,13; 1,81] p ₄₋₇ =0,1	17,98 [16,68; 19,9] p ₄₋₇ =0,052	4779 [4559; 5302] p ₄₋₇ =0,007*↑	1,19 [1,13; 1,48] p ₄₋₇ =0,0009*↓	9,86 [9,73; 12,2] p ₄₋₇ =0,0009*↓
Хвост эпидидимиса						
Группы	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх
НХГ (4)	2882 [2394; 3529]	5,03 [4,9; 5,31]	29,25 [27,31; 29,99]	3532 [2810; 4327]	6,05 [5,32; 6,71]	10,9 [9,72; 11,43]
L-NAME+НХГ (7)	2556 [1553; 4000] p ₄₋₇ =0,56	5,33 [5,04; 5,73] p ₄₋₇ =0,71	16,56 [13,76; 17,94] p ₄₋₇ =0,0009*↓	4483 [3300; 5511] p ₄₋₇ =0,37	3,09 [2,73; 4,24] p ₄₋₇ =0,041	5,99 [5,79; 6,64] p ₄₋₇ =0,004*↓

Дефицит оксида азота (II) в сочетании с гипоксией меняет соотношение изоформ ЛДГ в сторону увеличения ЛДГ1 в семенных пузырьках и хвосте эпидидимиса, и уменьшения ЛДГ1 и ЛДГх в головке эпидидимиса. В совокупности с полученными данными о содержании лактата и активности ферментов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) можно предположить, что в семенных пузырьках дефицит NO способствует адаптации к гипоксии за счёт увеличения анаэробного пути окисления субстратов, а в эпидидимисе в ответ на моделируемые условия активируется окислительное фосфорилирование.

Изменение степени карбонилирования белков при нормобарической хронической гипоксии и моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II)

Для оценки окислительной модификации белков (ОМБ) мы определяли степень карбонилирования белков по площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот (Фомина, 2014). В условиях НХГ

отмечалось повышение как общей площади под кривой, так и площади альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов (АДНФГ и КДНФГ) нейтрального и основного характера в митохондриях семенных пузырьков и головки эпидидимиса (Рисунок 6). В митохондриях хвоста эпидидимиса достоверных изменений изучаемых параметров не выявлено. В головке эпидидимиса отмечено значительное возрастание общей площади под кривой – в 17,8 раз по сравнению с контрольной группой ($p=0,0009$). Особенно выражено увеличение доли альдегидов нейтрального характера, которые считаются первичными маркёрами развития окислительного стресса, приводящего к фрагментации белков.

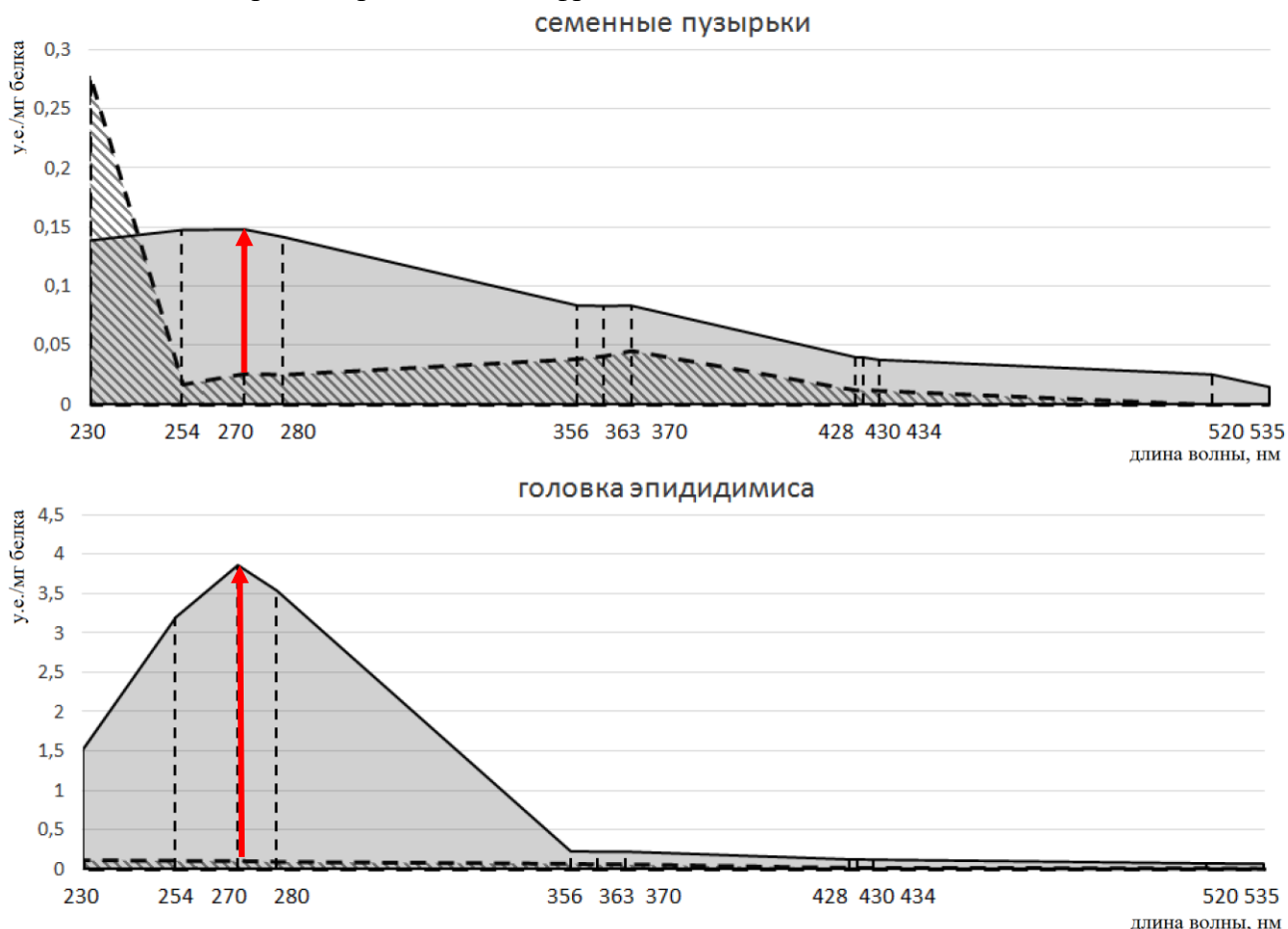


Рисунок 6 – Площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот в белках митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании нормобарической хронической гипоксии (сплошная заливка) в сравнении с нормоксией (штриховка)

Ключевую роль в развитии окислительного стресса играют скорость накопления активных форм кислорода (АФК) и эффективность антиоксидантных ферментов, в числе которых супероксиддисмутаза (СОД). В этой связи определение активности данного фермента является необходимым фактором в комплексной оценке оксидантного статуса клеток. Нами установлено, что в условиях НХГ активность СОД снижалась в семенных пузырьках на 81% ($p=0,0009$), в головке эпидидимиса на 78% ($p=0,00001$), в хвосте эпидидимиса на 77% ($p=0,018$).

Сочетание дефицита оксида азота (II) и НХГ в семенных пузырьках и головке придатка яичка характеризуется меньшим накоплением продуктов ОМБ относительно группы животных, подвергшихся только гипоксии, на 33,5% ($p=0,013$) и 87,5% ($p=0,0009$) соответственно, однако показатели достоверно выше, чем в группе животных, получавших только L-NAME; в хвосте придатка яичка установлена тенденция к снижению общей ОМБ.

При лабораторном исследовании окислительной модификации белков, произошедшей в организме исследуемого животного *in vivo*, так называемой спонтанной ОМБ, параллельно

происходит определение ОМБ, индуцируемой реакцией Фентона *in vitro*, – металл-катализируемой ОМБ, значения которой принимаются за 100%. Вычисление разницы этих показателей определяет ещё один важный параметр оценки оксидантного статуса – резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков (РАП), как доля потенциально-возможной ОМБ (в %).

Эффект дефицита NO проявился в тотальном снижении РАП в митохондриях всех изучаемых тканей. Так как уровень РАП определяется по металл-зависимой реакции, можно предположить, что снижение этого показателя будет свидетельствовать о высокой степени участия металлов переменной валентности в повреждении аминокислот, что в условиях L-NAME-опосредованного дефицита NO указывает на роль оксида азота (II) в связывании металлов и препятствовании их участия в развитии окислительного стресса. Сочетано с НХГ дефицит NO сопровождался понижением РАП относительно состояния нормоксии, но повышением по сравнению с серией эксперимента с применением L-NAME (Рисунок 7).

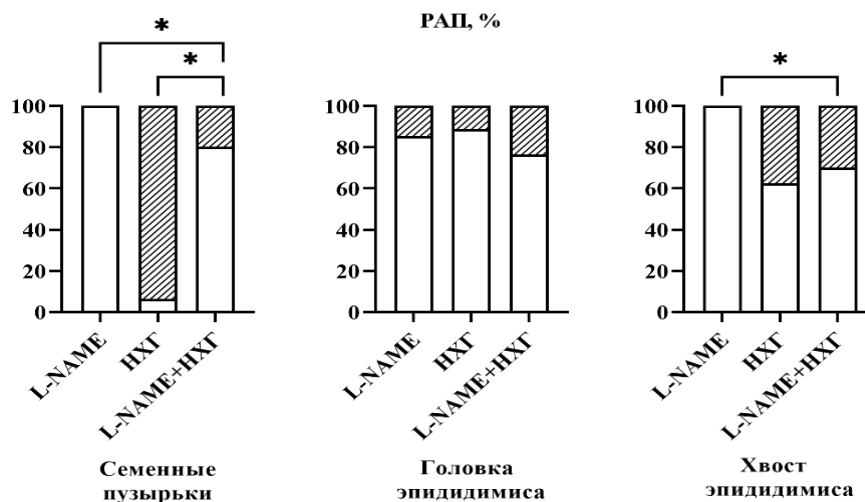


Рисунок 7 – Сравнение изменения резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий (РАП) при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO. *Примечания* – 100% – металл-зависимая ОМБ; свободная от штриховки часть шкалы – доля спонтанной ОМБ от металл-зависимой (%); заштрихованная часть шкалы – РАП ОМБ

В условиях гипоксии и при введении L-NAME отмечено повышение активности супероксиддисмутазы в семенных пузырьках и хвосте придатка яичка (Рисунок 8).

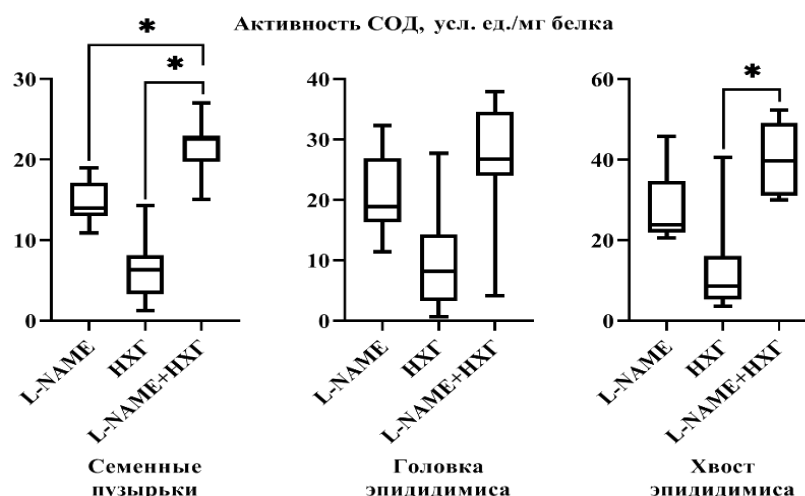


Рисунок 8 – Активность супероксиддисмутазы при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

Очевидно, в регуляции окислительно-восстановительного статуса митохондрий изучаемых тканей важную роль играет именно пул оксида азота (II) (Vanin, 2016). Адаптация к условиям кислорододефицита происходит, в том числе за счёт изменения белкового профиля клеток (Зорина, 2019), что может повлечь за собой увеличение количества мишеней для модификации, и, следовательно, повышение как спонтанной ОМБ, так и РАП, наблюдаемые в экспериментальной серии L-NAME+НХГ. Кроме того, дефицит NO на фоне гипоксии позволил сохранить активность СОД относительно эксперимента по моделированию НХГ, что также повлияло на скорость накопления ОМБ.

Изменение показателей метаболизма при хронической гипоксии и в условиях назначения L-аргинина, как субстрата для синтеза NO

Некоторые изменения, наблюдаемые в условиях получения экзогенного L-Арг, имеют сходную тенденцию с моделью НХГ (Таблица 4). В частности, это прослеживается в накоплении молочной кислоты, HIF1 α , и в активности ЦО. Повышение количества HIF1 α , вызванное влиянием различных веществ даже в условиях нормального напряжения кислорода, характеризуют, как состояние псевдогипоксии. Транскрипционная активность HIF1 α способствует дальнейшим преобразованиям метаболизма, что объясняет характер изменений в концентрации лактата и активности ЦО. Другими словами, можно сказать, что L-Арг проявляет гипоксия-подобный эффект (от англ. hypoxia-like).

Таблица 4 – Сравнение изменений биохимических показателей метаболизма в семенных пузырьках и эпидидимисе при моделировании НХГ и назначении L-аргинина

	Семенные пузырьки		Головка эпидидимиса		Хвост эпидидимиса	
	НХГ	L-Арг	НХГ	L-Арг	НХГ	L-Арг
HIF1α МФ	↓	↓		↓	↓	↓
HIF1α ЦФ		↑			↑	↑
Цитохромоксидаза	↓	↓	↓	↓	↓	↓
NO	↓	↓		↓	↓	↓
Сукцинат	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Лактат МФ	↓	↓	↓			↓
Лактат ЦФ	↑			↑		↑
ЛДГ МФ		↓	↓			↑
ЛДГ ЦФ			↓		↓	↑
СОД	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ОМБ	↑	↑	↑	↑		↑

Примечания – стрелочками обозначены показатели, имеющие статистически значимые изменения результатов

В семенных пузырьках L-Арг способствовал почти полному соответствию изменений, характерных для гипоксии, при этом в эксперименте с экзогенным получением животными L-Арг на фоне НХГ накопление HIF1 α в цитоплазме происходило эффективнее, чем в условиях только гипоксии – 5,26 [4,68; 6,22] против 2,99 [2,88; 4,29] ($p=0,002$). Возможно, сочетанное влияние этих факторов произвело некоторый кумулятивный эффект, что и послужило причиной повышения активности ЛДГ в цитоплазме клеток семенных пузырьков относительно состояния гипоксии на 171% ($p=0,014$) и лактата в митохондриях в 4,5 раза относительно как НХГ ($p=0,0009$), так и L-Арг ($p=0,0028$). Предположительно в основе этих изменений лежит опосредованная HIF активация экспрессии ЛДГ. Изменение активности фракций ЛДГ может свидетельствовать о положительном влиянии оксида азота (II) на экспрессию фермента и протективном действии L-аргинина в условиях депривации кислорода. В хвосте эпидидимиса при стимуляции синтеза NO наблюдалось снижение ЛДГ1 и повышение ЛДГх без изменения общей активности, что согласуется с нашим предположением о регуляции экспрессии фермента оксидом азота (II). Таким образом, L-

аргинин позволяет контролировать процессы при адаптации к дефициту кислорода посредством регуляции активности гипоксией индуцируемого фактора и ферментов, участвующих в энергетическом обмене.

Изменение степени карбонилирования белков при хронической гипоксии и в условиях назначения L-аргинина, как субстрата для синтеза NO

Получение L-аргинина животными приводило к повышению карбонильных производных белков: в семенных пузырьках на 95% ($p=0,0009$), в головке эпидидимиса на 107% ($p=0,002$), в хвосте эпидидимиса на 37% ($p=0,03$), что является подтверждением гипоксия-подобного эффекта L-аргинина, причём в митохондриях семенных пузырьков и головки эпидидимиса изменения не зависели от природы аминокислот, а в хвосте придатка яичка отмечалось увеличение АДНФГнейт в 1,9 раз ($p=0,003$). При назначении L-аргинина на фоне НХГ заметно, что действие препарата снижает продукцию карбонильных производных белков в тканях эпидидимиса относительно состояния гипоксии на 88% ($p=0,009$), но не вызывает достоверных изменений в семенных пузырьках. Резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков митохондрий семенных пузырьков и хвоста придатка яичка существенно не изменялся под влиянием L-аргинина, но в головке эпидидимиса наблюдалось его снижение с 92,3% до 27,8% ($p=0,0009$). При сочетанном воздействии гипоксии и L-аргинина в семенных пузырьках отмечалось снижение РАП относительно серии НХГ в 14,5 раз ($p=0,0009$), а в хвосте эпидидимиса – относительно серии L-Арг в 1,5 раз ($p=0,014$).

Применение L-аргинина при НХГ способствовало поддержанию высокого уровня активности супероксиддисмутазы в митохондриях семенных пузырьков и головки придатка яичка по сравнению с группой животных, подвергшихся воздействию только гипоксии (Рисунок 9). Кроме того, в этих тканях отмечается тенденция к снижению ДНФГ-производных нейтральных аминокислот, из чего можно сделать вывод, что увеличение активности супероксиддисмутазы в присутствии L-аргинина послужило фактором защиты от повреждения аминокислот нейтрального характера.

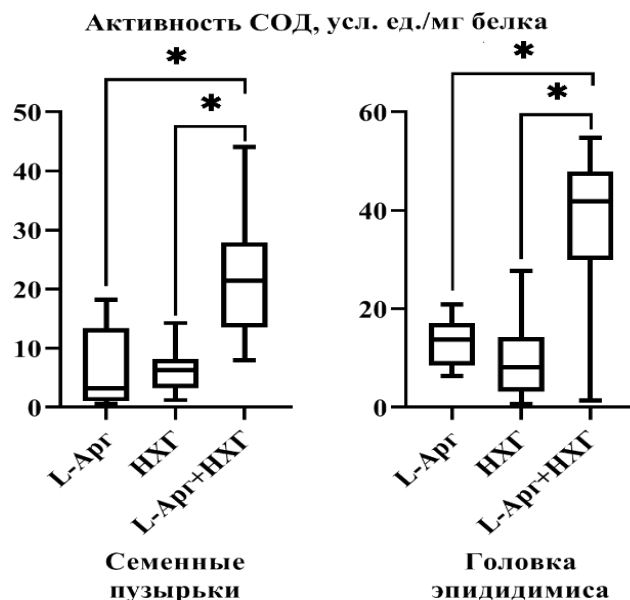


Рисунок 9 – Активность супероксиддисмутазы при моделировании НХГ и назначении L-аргинина

Изменение показателей метаболизма при хронической гипоксии и в условиях назначения сукцината

Курсовое (в течение 14 дней) назначение сукцината спровоцировало снижение количества HIF1 α в митохондриях семенных пузырьков на 31% ($p=0,031$), но не в цитоплазме без статистически значимого изменения соотношения этих фракций. В придатке яичка наблюдалось повышение HIF1 α ЦФ на 24% ($p=0,014$) в головке и на 128% ($p=0,0009$) в хвосте органа. Назначение сукцината при гипоксии не привело к изменению содержания этого белка относительно НХГ, а только способствовало изменению соотношения МФ / ЦФ в семенных пузырьках в сторону увеличения ЦФ на 57% ($p=0,005$). В семенных пузырьках в МФ и в хвосте эпидидимиса в МФ и ЦФ HIF1 α оказался ниже, чем при назначении сукцината на 47% ($p=0,005$), 50% ($p=0,0009$) и 45% ($p=0,0009$) соответственно.

Назначение сукцината привело к статистически значимому снижению активности ЦО в митохондриях эпидидимиса на 47% ($p=0,02$) в головке и 30% ($p=0,0009$) в хвосте, но не повлияло на активность СДГ и АТФ-синтазы. Наблюдаемое достоверное снижение концентрации метаболитов оксида азота (II) у животных, получавших сукцинат, относительно группы контроля (в головке придатка яичка на 40% ($p=0,014$) и в хвосте органа на 45% ($p=0,0009$)) может быть обусловлено эффектами HIF1 (Куо, 2010). При моделировании НХГ и назначении сукцината отмечалось повышение активности СДГ в хвосте эпидидимиса на 96% ($p=0,004$), но достоверных отличий в количестве метаболитов оксида азота (II) и активности ЦО в экспериментальных сериях выявлено не было. В то же время в митохондриях головки эпидидимиса активность АТФ-синтазы оказалась ниже, чем у животных, подвергшихся только гипоксии на 264% ($p=0,001$).

В гипоксических условиях получение животными экзогенного сукцината спровоцировало повышение общей активности ЛДГ ЦФ только в хвосте придатка яичка с 3532 [2810; 4327] до 6108 [5153; 6477] ($p=0,009$), где при этом снизилась доля ЛДГ1 ЦФ с 6,05 [5,32; 6,71] до 2,57 [2,29; 3,16] ($p=0,0009$). В семенных пузырьках содержание фракции ЛДГ1 МФ и ЦФ возросло по сравнению с получением только сукцината при сохранении общей активности фермента в 1,3 раз ($p=0,004$) и 1,2 раз ($p=0,004$) соответственно, а в головке эпидидимиса – только в цитоплазме в 1,9 раз ($p=0,004$). В условиях моделирования гипоксии на фоне получения сукцината количество лактата увеличивается в ЦФ семенных пузырьков на 98% ($p=0,0001$) относительно НХГ и 62% ($p=0,01$) относительно группы сравнения, получавшей только сукцинат, а в ЦФ хвоста придатка яичка снижается на 70% ($p=0,0005$) относительно группы, получавшей только сукцинат. В проксимальном отделе придатка яичка достоверных изменений не выявлено. Увеличение доли ЛДГ1 в митохондриях указывает на повышение скорости утилизации лактата. По-видимому, это имеет приспособительное значение, и лактат, таким образом, эффективнее вовлекается в энергетический обмен в условиях гипоксии и последующей реоксигенации, поддерживая баланс окислительно-восстановительных реакций и препятствуя развитию ацидоза.

Изменение биохимических показателей при назначении сукцината и изменённой генерации оксида азота (II)

Сочетанное действие сукцината и L-NAME или сукцината, L-NAME и НХГ не привело к изменению активности ЦО и АТФ-синтазы. У животных, получавших сукцинат и L-NAME одновременно, отмечалось статистически значимое повышение активности СДГ и понижение уровня сукцината в митохондриях семенных пузырьков относительно животных, получавших только L-NAME, на 832% ($p=0,003$) и 192% ($p=0,003$) соответственно, но достоверное снижение активности СДГ на 87% ($p=0,0009$), и повышение уровня сукцината на 54% ($p=0,002$) в хвосте эпидидимиса.

При сочетанном действии сукцината и L-NAME отмечалось снижение содержания молочной кислоты в митохондриях и цитоплазме хвоста придатка яичка на 62% ($p=0,003$) и 73% ($p=0,0009$) и цитоплазме семенных пузырьков на 53% ($p=0,01$). Сочетание дефицита оксида азота (II) и введения сукцината вызывало перераспределение изоформ ЛДГ: в митохондриях всех исследуемых тканей – увеличении доли ЛДГ1 по сравнению с группой, получавшей только сукцинат: в 6 ($p=0,0009$), 1,5 ($p=0,0009$) и 1,85 раз ($p=0,0019$) в семенных пузырьках, головке и хвосте эпидидимиса соответственно; при этом на фоне НХГ – снижение ЛДГ1 в цитоплазме семенных пузырьков в 1,5 раз ($p=0,0009$) и хвоста эпидидимиса в 1,8 раз ($p=0,0009$). Уменьшение доли ЛДГ1, преимущественно использующей в качестве субстрата молочную кислоту, сопровождалось падением уровня лактата, что может свидетельствовать об ускорении выведения этого метаболита из клеток. Подтверждением высказываемому предположению служит прирост лактата в плазме крови в условиях сочетанного действия L-NAME и сукцината на 29% ($p=0,003$), и всех трёх условий эксперимента на 47% ($p=0,003$).

Сравнение результатов исследований по моделированию НХГ, её коррекции сукцинатом и применении L-аргинина показало значимые отличия в содержании

метаболитов NO в митохондриях головки эпидидимиса: повышение в группе Сук+L-Арг против Сук на 63% ($p=0,016$); снижение активности СДГ на 72% ($p=0,0009$), повышение активности АТФ-синтазы на 66% ($p=0,001$) и 200% ($p=0,007$) и накопление сукцината на 74% ($p=0,0009$) и 71% ($p=0,0009$) в головке и хвосте эпидидимиса соответственно, что указывает на способность оксида азота (II) контролировать реверсивную работу СДГ. Таким образом, продемонстрировано, что введение L-аргинина в присутствии сукцината поддерживает работу дыхательной цепи и способствует активации окислительного фосфорилирования в условиях дефицита O_2 , в том числе за счёт реверсивного движения электронов через СДГ.

При моделировании дефицита оксида азота (II) путём неселективного ингибирования NOS или при индукции его синтеза L-аргинином эффекты янтарной кислоты в большей степени можно охарактеризовать как прооксидантные. Получение животными L-аргинина вызывает снижение уровня метаболитов NO, что связано с регуляцией эндогенного синтеза этой аминокислоты и экспрессией NO-синтазы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сукцинат реализует свои функции посредством NO. Вероятно, существует двустороннее влияние оксида азота (II) и сукцината на формирование адаптации к кислорододефициту: при моделировании дефицита NO концентрация сукцината снижается, а в присутствии сукцината повышается концентрация метаболитов NO. К тому же установлено, что активность СДГ значительно падает при дефиците оксида азота (II), что вносит свой вклад как в утилизацию сукцината в случае активирования окислительного фосфорилирования, так и в поддержании стабильной работы электрон-транспортной цепи в условиях кислорододефицита. Однако назначение при этом янтарной кислоты, как отдельно, так и в сочетании с НХГ, способствовало возвращению активности СДГ на прежний уровень.

Изменение степени карбонилирования белков при хронической гипоксии и в условиях назначения сукцината

Степень карбонилирования белков митохондрий возрастала в присутствии сукцината в головке эпидидимиса на 63,5% ($p=0,004$) и хвосте эпидидимиса на 94% ($p=0,005$), но при сочетании с НХГ этот параметр не превышал полученных значений. Сукцинат проявлял антиоксидантные свойства в условиях гипоксии, способствуя снижению окислительной модификации белков на 99% ($p=0,0009$) в головке и 54,5% ($p=0,0009$) в хвосте придатка яичка, а также повышению активности супероксиддисмутазы в семенных пузырьках на 283% ($p=0,0009$), в головке эпидидимиса на 196% ($p=0,01$) и хвосте эпидидимиса на 272% ($p=0,01$), при этом РАП ОМБ существенно не менялся.

Влияние сукцината на оксидантный статус клетки также зависимо от модуляции синтеза NO: в условиях кислорододефицита и физиологического синтеза оксида азота (II) сукцинат способствует снижению окислительного стресса, но при дефиците NO усугубляет развитие ОМБ (Таблица 5), однако снижает металл-зависимое окисление белков, что выражается в увеличении РАП ОМБ (Рисунок 10).

Таблица 5 – Площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот в белках митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината, в у.е./мг белка

Группы	Семенные пузырьки	Головка эпидидимиса
НХГ (4)	24,76 [20,08; 26,08]	319,12 [241; 363,6]
Сук+НХГ (11)	12,88 [11,28; 34,13] $p_{4-11}=0,32$	20,96 [19,82; 23,78] $p_{4-11}=0,0009^*\downarrow$
Сук+ L-NAME+НХГ (13)	38,76 [34,62; 45,67] $p_{4-13}=0,018$ $p_{11-13}=0,13$	151,72 [143,2; 160,3] $p_{4-13}=0,01$ $p_{11-13}=0,0009^*\uparrow$

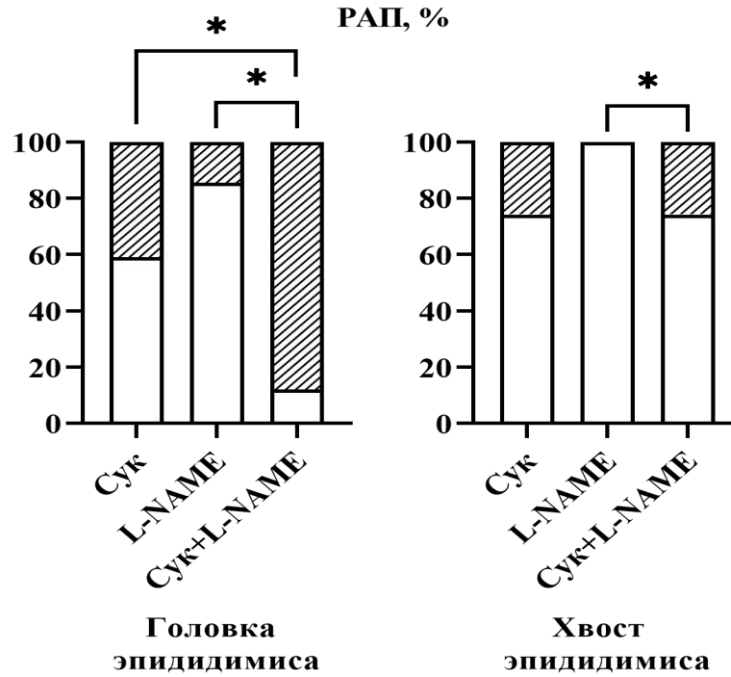


Рисунок 10 – Сравнение изменения резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий (РАП) при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината, в %

Анализ зависимости уровня гонадостероидов в плазме крови, биохимических показателей метаболизма и маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса

По результатам нашего исследования можно отметить тенденцию к снижению тестостерона в плазме крови при гипоксии, что согласуется с литературными данными о влиянии апноэ на стероидогенез (Xiong, 2021). В условиях НХГ отмечалось повышение активности α -глюкозидазы хвоста эпидидимиса на 53% ($p=0,004$), а в головке придатка яичка в условиях экспериментального дефицита NO зафиксировано снижение активности фермента на 26% ($p=0,04$). Получение животными L-аргинина привело к уменьшению тестостерона плазмы крови и фруктозы секрета семенных пузырьков (Таблица 6). Сочетание индукции синтеза NO и НХГ сопровождалось снижением тестостерона относительно группы НХГ и α -глюкозидазы головки эпидидимиса, но способствовало сохранению концентрации фруктозы на уровне контрольной группы и повышению α -глюкозидазы хвоста придатка яичка. Назначение сукцината вызвало снижение уровня эстрадиола и фруктозы, активности α -глюкозидазы в головке эпидидимиса, но повышение в хвосте органа. Сочетание Сук+НХГ характеризуется снижением активности каудальной α -глюкозидазы (Таблица 6).

Гонадостероиды имеют большое значение в регуляции антиоксидантной защиты клеток. Так, секреторная активность семенных пузырьков зависит от уровня тестостерона (Raj, 2021), тотальное отсутствие этого гормона приводит к снижению эффективности АОС, однако сам стероид способствует активации митохондриального окисления и, как следствие, увеличению продукции АФК, снижая при этом активность СОД (Tostes, 2016). Также экспериментально подтверждён антиоксидантный эффект эстрадиола при гипоксии (Laouafa, 2017). Можно заключить, что эффекты L-аргинина и сукцината при экспериментальном дефиците оксида азота (II), могут быть связаны с модуляцией синтеза этих гормонов.

Для интерпретации результатов исследования тканей и плазмы крови мы провели оценку тесноты взаимосвязи между показателями с помощью ранговой корреляции Спирмена с использованием шкалы Чеддока. Обнаруженная прямая корреляционная зависимость между уровнем эстрадиола плазмы крови и активностью α -глюкозидазы эпидидимиса ($r=0,41$, $p<0,05$) (Рисунок 11) может быть использована в медицине для интерпретации анализа крови и эякулята с целью установления не только проходимости протоков придатка яичка, но и его секреторной способности.

Таблица 6 – Содержание гонадостероидов крови и биохимических маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ, назначении L-аргинина и сукцината

Показатели	Плазма крови		Секрет семенных пузырьков	ЦФ эпидидимиса	
	Тестостерон, нмоль/л	Эстрадиол, пг/мл		головка	хвост
Группы			Фруктоза, мг/мг белка	α-глюкозидаза, у.е./мг белка	
НХГ (4)	20,01 [7,74; 35,89]	843,5 [776,2; 885,2]	7,68 [4,74; 11,14]	2,54 [2,33; 2,9]	4,62 [3,9; 5,13]
NaCl (5)	19,71 [14,98; 27,69]	885,8 [848,6; 924,7]	7,57 [5,53; 9,63]	2,86 [2,61; 3,88]	3,00 [1,7; 4,9]
L-Arg (8)	4,18 [2,42; 6,69] p ₅₋₈ =0,0039*↓	872,9 [805,7; 906,3] p ₅₋₈ =0,32	1,96 [1,38; 2,67] p ₅₋₈ =0,0009*↓	3,18 [2,65; 4,02] p ₅₋₈ =0,96	2,63 [2,45; 3,4] p ₅₋₈ =0,96
L-Arg+НХГ (9)	3,5 [2,83; 4,08] p ₄₋₉ =0,005*↓	782,7 [719,2; 899,6] p ₄₋₉ =0,56	7,91 [6,84; 16,42] p ₈₋₉ =0,0009*↑	1,25 [0,6; 2,12] p ₈₋₉ =0,0054*↓	7,14 [5,8; 7,75] p ₈₋₉ =0,0039*↑
Сук (10)	12,38 [5,77; 20,38] p ₅₋₁₀ =0,43 p ₄₋₁₁ =0,32	792,6 [760,4; 807,5] p ₅₋₁₀ =0,0019*↓ p ₄₋₁₁ =0,6	4,4 [4,04; 4,69] p ₅₋₁₀ =0,0039*↓ p ₄₋₁₁ =0,031	1,65 [1,46; 1,93] p ₅₋₁₀ =0,0028*↓ p ₄₋₁₁ =0,71	6,33 [5,73; 8,16] p ₅₋₁₀ =0,018*↑ p ₄₋₁₁ =0,0009*↓

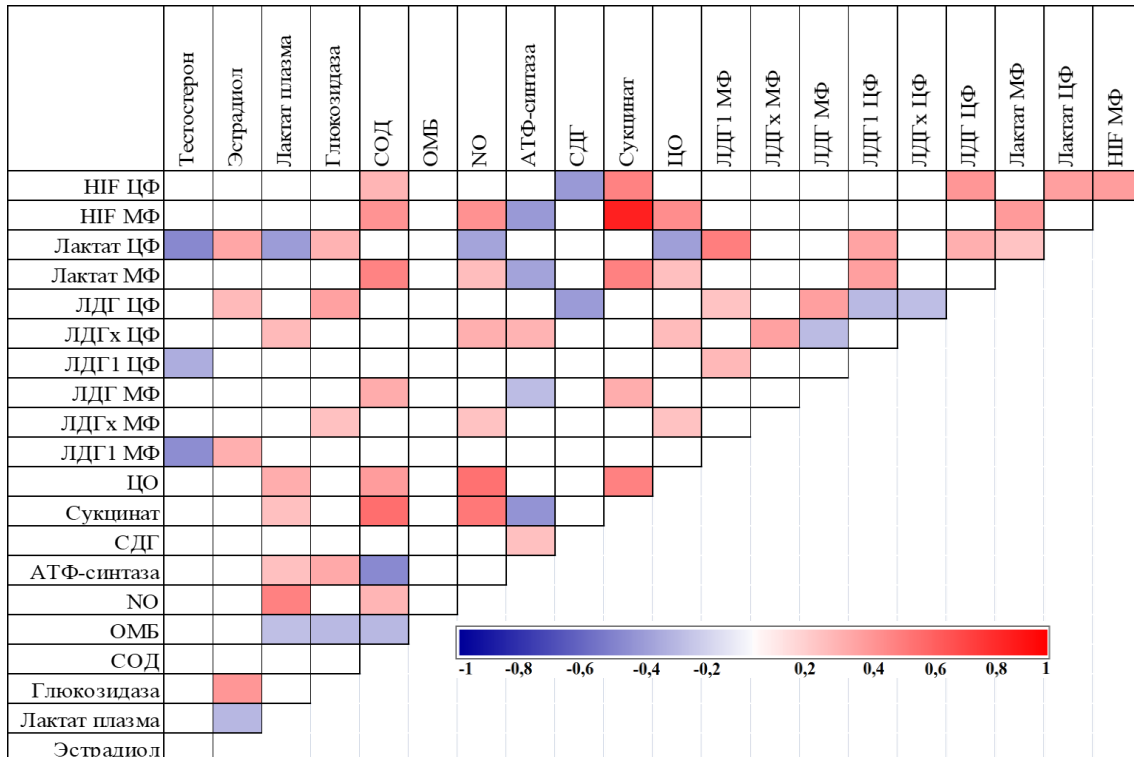


Рисунок 11 – Корреляционная взаимосвязь показателей головки эпидидимиса в экспериментах по моделированию НХГ и её коррекции сукцинатом и L-аргинином, представлены данные, имеющие достоверные значения $p < 0,05$

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие оксида азота (II) в регуляции функций митохондрий при гипоксии уже не является предметом споров, однако механизмы развития клеточного ответа и адаптационные стратегии, задействованные при этом, ещё предстоит уточнить. Наше исследование посвящено изучению воздействия нормобарической гипоксии на митохондрии семенных пузырьков и эпидидимиса в условиях изменённого синтеза оксида азота (II) и назначении животным сукцината в качестве антигипоксанта средства.

При моделировании НХГ наблюдается уменьшение времени, требуемого для достижения критического уровня кислорода и углекислого газа в герметичной камере, что может свидетельствовать об увеличении скорости потребления кислорода. При назначении сукцината длительность эксперимента по моделированию НХГ увеличивалась: животные дольше находились в камере к 14 дню эксперимента, по сравнению с первым, что подтверждает антигипоксанта эффект сукцината.

Активность цитохромоксидазы при моделировании хронической гипоксии резко снижается, и на этот процесс сильное влияние оказывает оксид азота (II): способствует снижению активности, особенно в условиях стимулирования синтеза L-аргинином. При этом синтез АТФ митохондриями не изменяется. При кислородном голодании дефицит NO сопровождается понижением синтеза ЛДГх, а стимуляция наработки оксида азота (II) с помощью L-аргинина, наоборот, усиливает этот процесс. В головке придатка яичка NO способствует повышению экспрессии ЛДГ1, что имеет положительные последствия для клеток при адаптации к нормобарической хронической гипоксии, обеспечивая более эффективную утилизацию лактата.

L-аргинин, как предшественник NO, активирует NIF1 α и способствует повышению его транскрипционной активности, тем самым вызывая состояние псевдогипоксии. Другими словами, L-аргинин обладает гипоксия-подобным эффектом, чем могут быть обусловлены его антиоксидантные свойства. Однако при этом зафиксировано снижение продукции тестостерона что, в свою очередь, является причиной задержки развития репродуктивной функции тканей и выражается понижением уровня фруктозы в семенных пузырьках.

Выявлен различный адаптационный потенциал митохондрий головки и хвоста придатка яичка к НХГ, что в условиях экспериментальной модели подтверждается повышением уровня ОМБ в первом случае, и отсутствием достоверных отличий во втором.

Установлена зависимость активности α -глюкозидазы эпидидимиса от уровня эстрадиола плазмы крови, что может послужить дополнительным диагностическим критерием для оценки обструкции протоков придатка яичка и его секреторной способности.

Сукцинат в качестве антигипоксанта средства проявил себя как антиоксидант только в условиях физиологического синтеза NO, что выражается в снижении окислительной модификации белков и стабилизации активности мембранно-связанных ферментов митохондрий, а также повышении активности супероксиддисмутазы – фермента антиоксидантной системы защиты клетки. Сукцинат и L-аргинин снижают ЛДГх в головке эпидидимиса, как по отдельности, так и совместно. В хвосте эпидидимиса сукцинат повышает общую активность ЛДГ в цитоплазматической фракции, снижает ЛДГ1 в обеих фракциях, но повышает ЛДГх, что указывает на его способность активировать энергетический обмен сперматозоидов, поскольку ЛДГх является специфической изоформой фермента именно этих клеток. В хвосте эпидидимиса при назначении экзогенной янтарной кислоты соотношение NIF1 α МФ / ЦФ резко снижено, что указывает на усиление транскрипционных эффектов NIF, в связи с чем в этой экспериментальной группе наблюдается повышение активности α -глюкозидазы дистального отдела придатка яичка.

Полученные результаты позволяют предположить, что адаптация к гипоксии в условиях индуцированного синтеза NO возможна за счёт гипоксия-подобного влияния L-аргинина и потенцирования антиоксидантной защиты, а в условиях экспериментального дефицита оксида азота (II) формируются неблагоприятные условия для работы электрон-транспортной цепи и реализации эффектов сукцината; снижено нитрозилирование

протеинов, а карбонилирование белков сопровождается полным истощением резервно-адаптационного потенциала.

4. ВЫВОДЫ

1. В условиях физиологического синтеза оксида азота (II) адаптация к нормобарической хронической гипоксии проходит по пути переключения с окислительного фосфорилирования на анаэробный тип метаболизма, что истощает пул оксида азота (II), о чём свидетельствует уменьшение концентрации метаболитов NO на 26% ($p=0,0028$) в семенных пузырьках и на 22% ($p=0,01$) в хвосте эпидидимиса, снижение активности ферментов дыхательной цепи и повышение содержания лактата в цитоплазме семенных пузырьков на 120% ($p=0,0085$). Экспериментальный дефицит оксида азота (II) на фоне гипоксии способствует активации окислительного фосфорилирования, что подтверждается высокими значениями активности ферментов дыхательной цепи, повышением скорости накопления молочной кислоты на 106% ($p=0,0019$) в цитоплазме хвоста эпидидимиса и активности лактатдегидрогеназы на 55% ($p=0,007$) в цитоплазме и на 285% ($p=0,003$) в митохондриях головки эпидидимиса.

2. Нормобарическая хроническая гипоксия сопровождается развитием окислительного стресса, о чём свидетельствует повышение степени карбонилирования белков на 165% ($p=0,01$) в семенных пузырьках и на 1682% ($p=0,0009$) в головке эпидидимиса, снижением активности антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы на 81% ($p=0,0009$), 78% ($p=0,00001$) и 77% ($p=0,018$) в семенных пузырьках, головке и хвосте эпидидимиса соответственно. В то же время экспериментальный дефицит оксида азота (II) нивелирует эффекты гипоксии, что выражается в снижении скорости накопления окислено модифицированных белков в митохондриях семенных пузырьков на 34% ($p=0,013$) и на 87% ($p=0,0009$) в головке эпидидимиса, и повышении активности супероксиддисмутазы на 257% ($p=0,0009$) в семенных пузырьках и на 360% ($p=0,0039$) в хвосте эпидидимиса.

3. Курсовое введение L-аргинина в качестве донора оксида азота (II) приводит к повышению уровня HIF1 α на 129% ($p=0,01$) и 32% ($p=0,024$), а также лактата на 191% ($p=0,03$) и 253% ($p=0,018$) в цитоплазме семенных пузырьков и хвоста эпидидимиса соответственно, снижению активности цитохромоксидазы на 72% ($p=0,0009$), 68% ($p=0,00001$) и 75% ($p=0,0027$) и количества сукцината на 40% ($p=0,005$), 53% ($p=0,0009$) и 51% ($p=0,0009$) в митохондриях семенных пузырьков, головки и хвоста эпидидимиса соответственно, что характеризует эффект этой аминокислоты, как гипоксия-подобный. Модуляция синтеза оксида азота (II) при нормобарической хронической гипоксии влияет на изменение экспрессии изоформ ЛДГ и скорость переключения метаболизма с аэробного на анаэробный тип.

4. Введение L-аргинина животным на фоне дефицита кислорода приводит к понижению окислительной модификации белков и повышению активности супероксиддисмутазы. L-аргинин снижает степень выраженности окисления аминокислот нейтрального характера в белках митохондрий семенных пузырьков и головки придатка яичка.

5. Сукцинат способствует поддержанию функционирования митохондрий: сохранению активности ферментов ЭТЦ в условиях гипоксии и при L-NAME-опосредованном дефиците NO. В условиях гипоксии, её коррекции сукцинатом и индуцированном синтезе NO установлено повышение активности АТФ-синтазы на 142% ($p=0,0009$) в хвосте эпидидимиса, доли ЛДГ1 на 165% ($p=0,0009$) в семенных пузырьках и 51% ($p=0,004$) в головке придатка яичка, и лактата на 77% ($p=0,0014$) и 75% ($p=0,0009$) в головке и хвосте эпидидимиса соответственно, что указывает на поддержание в этих условиях высокой активности окислительного фосфорилирования и внутриклеточной утилизации лактата.

6. В условиях нормобарической хронической гипоксии и физиологического синтеза оксида азота (II) сукцинат способствует снижению скорости развития окислительного стресса. Применение сукцината при дефиците NO усугубляет развитие окислительной

модификации белков, но противодействует металл-зависимому окислению белков, увеличивая резервно-адаптационный потенциал ОМБ.

7. Введение L-аргинина провоцирует снижение уровня тестостерона плазмы крови на 79% ($p=0,0039$), а введение янтарной кислоты – снижение фруктозы секрета семенных пузырьков на 42% ($p=0,0028$). Применение сукцината в условиях изменённого синтеза оксида азота (II) способствует повышению активности α -глюкозидазы на 254% ($p=0,0039$) в головке эпидидимиса, при этом применение янтарной кислоты в качестве антигипоксанта средства ассоциировано с повышением уровня эстрадиола плазмы крови на 36% ($p=0,0009$) и снижением количества фруктозы секрета семенных пузырьков на 60% ($p=0,0009$).

5. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И. Влияние сукцината на некоторые показатели биоэнергетического обмена в семенных пузырьках и эпидидимисе у самцов крыс в условиях хронической гипоксии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т.24, №2. – С. 49-54.

2. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И., Соловых Д.А. Влияние модуляции синтеза оксида азота (II) при хронической нормобарической гипоксии на изоферментный спектр лактатдегидрогеназы эпидидимиса крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т. 26, № 1. – С. 49-54.

3. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И., Карасёва А.А. Окислительное повреждение липидов и белков митохондрий под влиянием сукцината и на фоне экспериментального дефицита оксида азота (II) // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2021. – №3. – С. 54-59.

4. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И., Сучкова О.Н. Способ моделирования нормобарической хронической гипоксии у крыс самцов сток WISTAR // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2022. – Т.10, №2. – С. 147-156.

5. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И. Изменение некоторых биохимических показателей митохондрий при адаптации к гипоксии // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2021. – №5. – С. 64-68.

6. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И. Изменение количества HIF1 α при хронической нормобарической гипоксии и на фоне получения сукцината // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2021. – №4. – С. 72-80.

7. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И., Петров А.В. Анализ окислительной модификации белков митохондрий эпидидимиса крыс при нормобарической хронической гипоксии и модуляции синтеза оксида азота (II) // Казанский медицинский журнал. – 2022. – Т. 103, №6. – С. 976-985.

8. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И. Гипоксия-подобный эффект L-аргинина в тканях семенных пузырьков и эпидидимиса крыс // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2023. Т. 31, № 3. С. 345–356.

9. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И., Бельских Э.С., Тихонова Р.А. Аргинин и сукцинат как факторы, поддерживающие окислительное фосфорилирование митохондрий при гипоксии // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2024. – №2. – С. 10-18.

10. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И. Оценка влияния L-аргинина на динамику некоторых биохимических показателей эпидидимиса лабораторных животных // Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий: материалы I Международной научно-практической конференции (Кемерово, 27 ноября 2020 г.) / отв. ред. В.М. Позняковский, Е.М. Мальцева. – Кемерово: КемГМУ, 2020. – 334 с. С. 87-90.

11. **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И., Сучкова О.Н. Оценка влияния сукцината и экспериментального дефицита оксида азота на активность мембранно-связанных ферментов митохондрий семенных пузырьков самцов крыс // Материалы ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвящённой 70-летию основания ВУЗа на Рязанской земле, Рязань, 18 декабря 2020 года. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2020. – С. 107-109.

12. **Марсянова Ю.А.** Оценка влияния гипоксии на развитие окислительного стресса в эпидидимисе самцов крыс при нормобарической хронической гипоксии // Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины: сборник статей XXII Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, 12-16 апреля, 2021 г., Владивосток [Электронный ресурс] / под общ. ред. В.Б. Шуматова; Тихоок. гос. мед. ун-т. – Электрон. дан. – Владивосток: Медицина ДВ, 2021. – [515 с.]. ISBN 978-5-98301-236-3. С. 481-484.

13. Федоськина А.К., **Марсянова Ю.А.** Изменение основных показателей секрета семенных пузырьков при гипоксии и на фоне введения сукцината // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2021: Сборник тезисов LXXXII научно-практической конференции с международным участием / Отв. ред. Н.А. Гавришева. – СПб., 2021. – 220 с. С. 19-20.

14. Федоськина А.К., **Марсянова Ю.А.**, Звягина В.И., Карасёва А.А. Оценка изменения окислительной модификации белков и липидов митохондрий придатка яичка крыс при экспериментальном дефиците оксида азота (II) и на фоне приёма сукцината // Актуальные вопросы медицины и высшего медицинского образования: Прил. к ежегодному сб. науч. тр. Проблемы и вызовы фундаментальной и клинической медицины в XXI веке. – Б.: 2021. – вып. 21. – 516 с. С. 86-87.

15. **Марсянова Ю. А.**, Звягина В.И. Изменение функциональной активности семенных пузырьков в условиях модуляции синтеза NO // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева : Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Рязань, 26–27 января 2022 года. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2022. – С. 50-52.

16. Патент № 2739675 С1 РФ, МПК G09В 23/28. Способ моделирования нормобарической хронической гипоксии / **Ю. А. Марсянова**, В. И. Звягина. – заявл. 17.07.2020 : опубл. 28.12.2020. – Бюл. № 1. Тест (визуальный): непосредственный.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразон

L-Арг – L-аргинин

АДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразоны альдегидных производных аминокислот

АФК – активные формы кислорода

КДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразоны кетоновых производных аминокислот

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МФ – митохондриальная фракция

НО – нормоксия

НХГ – нормобарическая хроническая гипоксия

ОМБ – окислительная модификация белков

РАП – резервно-адаптационный потенциал

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

СОД – супероксиддисмутаза

Сук – сукцинат

ЦО – цитохромоксидаза

ЦФ – цитоплазматическая (безмитохондриальная) фракция

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

HIF – hypoxia-inducible factor, фактор, индуцируемый гипоксией

L-NAME – N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester, метиловый эфир N(ω)-нитро-L-аргинина