

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, доцент  
Звягина Валентина Ивановна

Рязань – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	16
1.1. ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МИТОХОНДРИЙ КАК ПРИЧИНА И СЛЕДСТВИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА.....	16
1.1.1. Общие представления о митохондриях .....	16
1.1.2. Митохондриальные дисфункции .....	17
1.1.3. Характеристика отдельных ферментов и их участие в развитии митохондриальных дисфункций.....	18
1.1.4. Активные формы кислорода .....	20
1.2. ОКСИД АЗОТА (II) И ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ .....	24
1.2.1. Синтез оксида азота (II) в биологических системах.....	24
1.2.2. Регуляция синтеза оксида азота (II) L-аргинином .....	25
1.2.2.1. Другие источники NO .....	26
1.2.2.2. Ингибирование синтазы оксида азота .....	27
1.2.3. Эффекты оксида азота (II) на уровне субклеточных структур и целого организма.....	29
1.2.3.1. Активные формы азота .....	30
1.2.3.2. Дефицит оксида азота (II) .....	31
1.3. ДЕФИЦИТ КИСЛОРОДА И ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ .....	32
1.3.1. Гипоксия: основные экспериментальные модели.....	32
1.3.2. Механизмы адаптации к дефициту кислорода.....	35
1.3.2.1. Реакция электрон-транспортной цепи на гипоксию .....	35
1.3.2.2. Фактор, индуцируемый гипоксией .....	37
1.3.2.3. Пути регуляции активности HIF .....	38
1.3.2.4. Эффекты гипоксией индуцируемого фактора.....	39
1.3.3. Патогенез при гипоксии. Факторы, влияющие на патогенез.....	41
1.3.3.1. Гипоксия и активные формы кислорода .....	41
1.3.3.2. Окислительная модификация белков (ОМБ).....	43
1.3.3.3. Взаимное влияние гипоксии и продукции оксида азота (II).....	45
1.3.3.4. Участие сукцината в патогенезе и адаптации при гипоксии .....	46
1.3.3.5. Участие лактата в патогенезе и адаптации при гипоксии.....	49
1.3.3.6. Гиперкапния .....	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	52
2.1. РАБОТА С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ.....	52

2.1.1. Дизайн исследования: .....	52
2.1.2. Экспериментальная модель гипоксии и схема введения препаратов .....	54
2.1.2.1. Моделирование нормобарической острой гипоксии (НОГ) .....	54
2.1.2.2. Моделирование нормобарической хронической гипоксии (НХГ) .....	54
2.1.2.3. Введение экзогенного сукцината .....	55
2.1.2.4. Моделирование дефицита оксида азота (II) .....	55
2.1.2.5. Введение экзогенного L-аргинина .....	55
2.2. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	56
2.2.1. Получение биологического материала .....	56
2.2.2. Методы исследования биологического материала .....	57
2.2.2.1. Определение концентрации общего белка .....	57
2.2.2.2. Определение концентрации молочной кислоты .....	58
2.2.2.3. Определение концентрации сукцината .....	58
2.2.2.4. Определение количества $\alpha$ -субъединицы гипоксией индуцируемого фактора (HIF1 $\alpha$ ) .....	59
2.2.2.5. Определение концентрации метаболитов оксида азота (II) .....	59
2.2.2.6. Определение концентрации фруктозы .....	60
2.2.2.7. Определение содержания тестостерона и эстрадиола .....	60
2.2.2.8. Определение содержания продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) .....	61
2.2.2.9. Определение активности $\alpha$ -глюкозидазы .....	61
2.2.2.10. Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) .....	62
2.2.2.11. Определение активности цитохромоксидазы (ЦО) .....	62
2.2.2.12. Определение активности $H^+$ /АТФ-синтазы .....	62
2.2.2.13. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) .....	63
2.2.2.14. Определение общей активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) .....	63
2.2.2.15. Определение изоформ лактатдегидрогеназы .....	64
2.3. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ .....	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	67
3.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ .....	67
3.2. ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И L-NAME-ОПОСРЕДОВАННОМ ДЕФИЦИТЕ ОКСИДА АЗОТА (II) .....	74
3.2.1. Изменение биохимических показателей при нормобарической хронической гипоксии .....	74

3.2.2. Изменение биохимических показателей при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II) .....	79
3.3. ИЗМЕНЕНИЕ СТЕПЕНИ КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ ГИПОКСИИ И L-NAME-ОПОСРЕДОВАННОМ ДЕФИЦИТЕ ОКСИДА АЗОТА (II) .....	89
3.3.1. Изменение степени карбонилирования белков при нормобарической хронической гипоксии .....	89
3.3.2. Изменение степени карбонилирования белков при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II) .....	91
3.4. ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И В УСЛОВИЯХ НАЗНАЧЕНИЯ L-АРГИНИНА, КАК СУБСТРАТА ДЛЯ СИНТЕЗА NO .....	96
3.5. ИЗМЕНЕНИЕ СТЕПЕНИ КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И В УСЛОВИЯХ НАЗНАЧЕНИЯ L-АРГИНИНА, КАК СУБСТРАТА ДЛЯ СИНТЕЗА NO .....	107
3.6. ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И В УСЛОВИЯХ НАЗНАЧЕНИЯ СУКЦИНАТА.....	111
3.6.1. Изменение биохимических показателей при назначении сукцината ....	111
3.6.2. Изменение биохимических показателей при назначении сукцината и при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II).....	120
3.6.3. Изменение биохимических показателей при назначении сукцината и L-аргинина.....	127
3.7. ИЗМЕНЕНИЕ СТЕПЕНИ КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И В УСЛОВИЯХ НАЗНАЧЕНИЯ СУКЦИНАТА .....	135
3.7.1. Изменение степени карбонилирования белков при назначении сукцината .....	135
3.7.2. Изменение степени карбонилирования белков при назначении сукцината и при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II) .....	138
3.7.3. Изменение степени карбонилирования белков при назначении сукцината и L-аргинина.....	143
3.8. АНАЛИЗ ЗАВИСИМОСТИ УРОВНЯ ГОНАДОСТЕРОИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ, БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА И МАРКЕРОВ СЕКРЕТА СЕМЕННЫХ ПУЗЫРЬКОВ И ЭПИДИДИМИСА .....	147
3.8.1. Изменение уровня гонадостероидов в плазме крови и биохимических маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса.....	147
3.8.2. Анализ результатов исследования и оценка силы корреляционной связи между показателями семенных пузырьков.....	152

3.8.3. Анализ результатов исследования и оценка силы корреляционной связи между показателями головки эпидидимиса .....	158
3.8.4. Анализ результатов исследования и оценка силы корреляционной связи между показателями хвоста эпидидимиса.....	161
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	165
ГЛАВА 5. ВЫВОДЫ.....	171
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	174
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	176
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	178
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	180

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [194], регулирует сократительную способность семенных пузырьков, брачное поведение и гормональный статус [206]. Молекулярный механизм эффектов NO при адаптации к гипоксии активно рассматривается в современной исследовательской практике [13, 97, 144, 212]. В митохондриях NO понижает активность цитохромоксидазы [239], способствует проявлению транскрипционного ответа на дефицит кислорода с помощью фактора, индуцируемого гипоксией (HIF) [283]. Однако в литературе встречаются экспериментальные данные о положительном влиянии дефицита NO на мужскую фертильность [171]. Подобные противоречия вызывают необходимость детального рассмотрения вопроса использования доноров и ингибиторов синтеза NO для решения проблемы бесплодия.

К настоящему времени сформировано представление о регуляции метаболизма при кислорододефиците в основных кислородчувствительных тканях млекопитающих: головном мозге, легком, мышцах, почках [12, 14, 39, 66, 86, 208, 161, 162, 163, 283]. 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 [38, 40], 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 [10, 13, 22, 23, 24, 77, 116, 134, 203].

Установлено негативное влияние L-NAME-индуцированного дефицита NO на состояние митохондрий придатка яичка [26, 30], и подтверждено протективное действие предшественника NO L-аргинина в условиях метиониновой нагрузки [64], а также на примере других тканей при митохондриальных заболеваниях [111], дисфункции эндотелия [184], и церебральной гипоксии [214]. Определена роль NO в качестве регулятора в патогенезе больных бронхиальной астмой [33] и подтверждено развитие дисфункции митохондрий при дефиците оксида азота (II) в тканях лёгких на моделях лабораторных животных [27].

Развитие митохондриальной дисфункции также было подтверждено исследованиями пациентов, страдавших от болезней, сопряжённых с нарушением кислородообеспечения организма [32, 73]. 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 [205], 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 [9], что само по себе является неблагоприятным фактором для созревания сперматозоидов [284], но оказалось малоэффективным для имитации глубоких и устойчивых изменений метаболизма митохондрий [8]. В другом исследовании было показано, что сукцинат способствует снижению свободно-радикальных процессов [28], что, в совокупности с литературными данными о его сигнальной и регуляторной роли [255], 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 NIF-опосредованного механизма адаптации сукцинатом [11, 40, 256], который также вызывает неоваскуляризацию [275], гемопоэз [122], продукцию и NO [173] и сукцинирование белков митохондрий. По-видимому, сукцинат и оксид азота (II) действуют, как синергисты, вызывая дилатацию сосудов, что облегчает доступ кислорода к тканям [227], 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) [232]; HIF1 $\alpha$  с помощью ИФА набора (ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 $\alpha$ ), Cloud-Clone Corp., США); метаболитов оксида азота (II) по способности восстанавливать хлорид ванадия [53]; молочной кислоты энзиматическим методом реакцией Триндера набором для определения концентрации молочной кислоты в биологических жидкостях (Ольвекс Диагностикум, Россия) [112]; сукцината диагностическим набором Succinate Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich Corporation, США) [257]; фруктозы по реакции Селиванова [247]; 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 [79], расчёты производили с помощью программы для ЭВМ [67]. Определение активности лактатдегидрогеназы проводили оптимизированным кинетическим методом с помощью набора ЛДГ-Ольвекс (Ольвекс Диагностикум, Россия) [282]; активности сукцинатдегидрогеназы спектрофотометрическим методом по степени восстановления феррицианида калия [54]; активности  $\alpha$ -гликозидазы набором  $\alpha$ -Glucosidase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich Corporation, США) [172]; активности цитохромоксидазы по изменению оптической плотности раствора цитохрома с при окислении в присутствии фермента [78]; активности H<sup>+</sup>/АТФ-синтазы по скорости гидролиза АТФ [5]; активности супероксиддисмутазы по скорости ингибирования реакции аутоокисления кверцетина [34]. Определение фракций лактатдегидрогеназы методом электрофореза в полиакриламидном геле (CN-PAGE) [72] с последующей детекцией *in situ* по ферментативной активности лактатдегидрогеназы [68].

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования**

В рамках исследовательской работы усовершенствована методика определения активности цитохромоксидазы [78], разработан и запатентован

способ моделирования нормобарической хронической гипоксии [50, 62], 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 $\alpha$ , 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/реоксигнации, 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  $\alpha$ -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 гипоэнергетического 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 антигипоксикантные 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 из них в журналах перечня ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 2 – 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.

### **Объем 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. Объем работы составляет 216 страниц машинописного текста, включает 65 рисунков и 27 таблиц. Список литературы охватывает 287 источников, 81 из них российских и 206 зарубежных.

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую благодарность: научному руководителю доценту кафедры биологической химии, д.м.н., доценту В.И. Звягиной за инициацию и организацию работы, определение целей, задач и путей достижения результатов, бесценный опыт и поддержку на всех этапах исследования: от планирования до представления работы к защите; ректору ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава, д.м.н., профессору Р.Е. Калинину, проректору по научной работе и инновационному развитию ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору И.А. Сучкову и заведующему кафедрой биологической химии, к.м.н., доценту И.В. Матвеевой за возможность выполнения исследования на базе университета и всестороннюю поддержку.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МИТОХОНДРИЙ КАК ПРИЧИНА И СЛЕДСТВИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

#### 1.1.1. Общие представления о митохондриях

Митохондрии встречаются у подавляющего большинства эукариот [82], и в зависимости от типа клеток их количество в одной соматической клетке варьирует от 500 до 2000, в то же время в сперматозоидах их насчитывается около 50-75, а в ооците –  $10^5$ - $10^8$ , благодаря чему поддерживается передача митохондрий между поколениями от матери, а не от отца, к детям [191], кроме того, современные исследования всё чаще описывают явление обмена митохондриями между клетками одного организма: секреции одними клетками для донорства другим [261]. Функции митохондрий многочисленны. Помимо наиболее известной – энергетической функции – описано участие этих органелл в формировании врождённого иммунитета, передаче сигналов, апоптозе и клеточной дифференцировке, росте и поддержании контроля над клеточным циклом, включая сперматогенез [56, 271]. Многообразие функций способствует компартментализация этих органелл. Выделяют наружную мембрану, межмембранное пространство, внутреннюю мембрану, образующую кристы, и матрикс. Наружную и внутреннюю мембраны пронизывает Са-зависимый канал, образованный комплексом белков, который называют «порой, меняющей проницаемость мембраны митохондрии» (МТР или МРТР, от англ. mitochondrial permeability transition pore) [36]. Большая часть генов белков (около 1000), участвующих в метаболизме митохондрий, находится в ядерной ДНК, однако эти органеллы сохранили собственный аппарат для синтеза белка, включая мтДНК и рибосомы. Митогеном поддерживает экспрессию 37 белков, 13 из которых – субъединицы комплексов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [40, 198]. Большое количество митохондрий с собственной ДНК, которая мутирует гораздо чаще, чем ядерная [101] и имеет меньшую способность к репарации, приводит к

интересному явлению, которое называется гетероплазмия – генетический полиморфизм митохондрий в одной клетке.

Метаболический путь окисления субстратов с участием белковых комплексов ЭТЦ митохондрий, при котором энергия запасается в виде макроэргических связей АТФ, называется окислительным фосфорилированием. В этом процессе электроны передаются от восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД) убихинону через комплекс I, что сопровождается выкачиванием протонов из матрикса в межмембранное пространство, или от сукцината через комплекс II [202]. Комплекс III осуществляет окисление убихинола, перенося два электрона последовательно на два цитохрома c и два протона в межмембранное пространство. На терминальном участке переносимый цитохромом c электрон переходит на кислород с помощью комплекса IV, который выкачивает восемь протонов из матрикса: четыре участвуют в восстановлении  $O_2$  до  $H_2O$ , а четыре поступают в межмембранное пространство. В результате работы электрон-транспортной цепи нарабатывается электрохимический градиент протонов между матриксом и межмембранным пространством. Рассеяние градиента происходит в результате их перехода обратно в матрикс через комплекс V, что сопровождается образованием АТФ [202]. Помимо энергопродукции этот процесс решает несколько задач: участие в катаболизме субстратов, окисление восстановленных коферментов, регуляция метаболизма митохондрий и управление клеточным метаболизмом [215]. Нарушение окислительного фосфорилирования может привести к гибели клеток мозга, мышц и сердца, которые особенно остро нуждаются в большом количестве энергии.

### **1.1.2. Митохондриальные дисфункции**

Термин «митохондриальные дисфункции» относится к большой группе патологических состояний, приводящих к дефектам митохондриальных метаболических путей, нарушению энергопродукции, снижению синтетической, регуляторной функции, неадекватному количеству митохондрий или их aberrантной морфологии, в тяжёлых случаях – к апоптозу клетки [102]. Основной

причиной первичных митохондриальных дисфункций являются мутации, возникающие как в ядерном, так и в митогеноме [101], подтверждены для 413 генов [244]. В других случаях патология развивается на фоне заболевания, вследствие воздействия окружающей среды, несоблюдения здорового образа жизни и т.п., что характеризуется как «вторичная митохондриальная дисфункция» и проявляются в виде дефектов работы ЭТЦ и сокращение количества продуцируемой АТФ [32, 51].

Диагностика патологий, сопровождающихся митохондриальными дисфункциями, крайне трудна, так как разнообразие причин нарушений, вариабельность клеток по количеству митохондрий и гетероплазмия приводит к стиранию корреляции генотип-фенотип [96, 102]. Одним из самых показательных примеров заболеваний, связанных с первичным нарушением функций митохондрий, можно назвать синдром Лея. У больных развивается слабый мышечный тонус, непроизвольные сокращения мышц и проблемы с движением и равновесием, потеря чувствительности и слабость в конечностях, кардиомиопатия и недостаточность дыхания. Синдром развивается вследствие нарушения работы более 75 генов. Среди них гены белковых комплексов I, IV и V, участвующих в генерации энергии [185]. Синдром множественных митохондриальных дисфункций характеризуется нарушением сразу нескольких этапов производства энергии.

### **1.1.3. Характеристика отдельных ферментов и их участие в развитии митохондриальных дисфункций**

*Лактатдегидрогеназа* (ЛДГ, LDH, от англ. lactate dehydrogenase, КФ 1.1.1.27) – фермент, катализирующий взаимопревращение пирувата и лактата, поддерживая при этом баланс редокс-пары НАДН/НАД<sup>+</sup>. Обычно ЛДГ считают цитоплазматическим ферментом, однако он обнаружен и в митохондриях [20], где обеспечивает включение в энергетический обмен молочной кислоты, поступающей в матрикс через транспортёр монокарбоксилата (МСТ, от англ. monocarboxylate transporter) [104, 105].

У млекопитающих фермент представлен несколькими изоформами, образованными сочетанием продуктов экспрессии трёх генов: *LDHA*, *LDHB*, *LDHC* (ЛДГ1 – В4, ЛДГ2 – А1В3, ЛДГ3 – А2В2, ЛДГ4 – А3В1, ЛДГ5 – А4, ЛДГх – С4) [266]. ЛДГх и ЛДГ1 обладают повышенным сродством к лактату, а ЛДГ5 – к пирувату [178], при этом продукты экспрессии *LDHB* представляет основную долю активности в сердечной мышце, *LDHA* – в печени; а *LDHC* считается специфичной для семенников [178]. Доля активности ЛДГх в сперматозоидах достигает 80% от общей активности фермента; многочисленные исследования подтвердили его наличие в цитоплазме и митохондриях сперматозоидов, наружной мембране и капсуле акросомы, где этот фермент играет важную метаболическую роль в движении гамет по женским половым путям и последующей капацитации [141].

**Аденозинтрифосфатсинтаза** (АТФ-синтаза, КФ 7.1.2.2), или комплекс V ЭТЦ, фермент окислительного фосфорилирования, использующий энергию протонного потенциала на синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата [202, 215]. Дефицит АТФ-синтазы может проявляться из-за нарушения экспрессии генов, кодирующих собственно субъединицы фермента [225] или трансмембранного белка 70, который участвует в сборке комплекса V [114].

**Сукцинатдегидрогеназа** (СДГ, SDH, от англ. succinate dehydrogenase, КФ 1.3.5.1), или комплекс II ЭТЦ, является также ферментом цитратного цикла, кодируется только ядерным геномом [40]. СДГ млекопитающих состоит из четырёх субъединиц (SDHA-D), первая из которых имеет активный центр с ковалентно связанным флавинадениндинуклеотидом (ФАД). ФАД играет роль акцептора электронов в реакции окисления сукцината. SDHB имеет три последовательно расположенных железосерных кластера, которые осуществляют перенос электронов дальше на убихинон. Вместе субъединицы В, С и D отвечают за связывания с убихиноном, а С и D – за связывание с внутренней мембраной митохондрий [201]. Дефекты комплекса II могут затрагивать любой из генов субъединиц СДГ и встречаются примерно в 2% случаев всех диагнозов недостаточности ЭТЦ [246].

**Цитохромоксидаза** (ЦО, СОХ, от англ. cytochrome c oxidase, КФ 7.1.1.9), или комплекс IV электрон-транспортной цепи, представляет собой сложный трансмембранный комплекс, состоящий из 14 субъединиц, которые закодированы ядерным и митохондриальным геномом (I, II и III) [40]. К недостаточности ЦО приводят мутации более чем в 20 генах [147]. В числе этих генов субъединицы фермента или белки, отвечающие за сборку комплекса. Консервативная субъединица фермента СОХI служит для восстановления кислорода, включает два гема, обозначаемые, как цитохром а и а3, и два атома меди Cu. Возможность присоединять сразу 4 электрона очень важна для реакции восстановления кислорода, так как позволяет избегать образования промежуточных продуктов, именуемых активными формами кислорода.

#### 1.1.4. Активные формы кислорода

Высоко реакционноспособные вещества, образующиеся при неполном восстановлении  $O_2$ , называют активными формами кислорода (АФК). К ним относят супероксид  $O_2^{\cdot-}$ , гидропероксильный радикал  $HO_2^{\cdot-}$ , гидроксильный радикал  $HO^{\cdot}$  и алкоксильный радикал  $RO^{\cdot-}$ , а также пероксид водорода  $H_2O_2$  [278]. Супероксид образуется в ходе одноэлектронного восстановления молекулы кислорода:



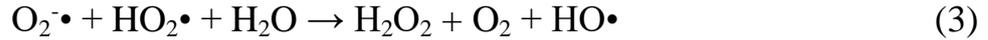
По своей природе  $O_2^{\cdot-}$  одновременно является радикалом и анионом, поэтому часто его называют супероксидный анион или супероксидный радикал. Образуется в результате утечки электронов из электрон-транспортной цепи митохондрий, при разобщении работы синтазы оксида азота (II), в результате работы цитохром P<sub>450</sub>-зависимых оксигеназ, или НАДФН-оксидазы. В большинстве случаев реакции являются побочными [228, 265, 278], в то время как нейтрофилы, богатые НАДФН-оксидазой, намеренно производят большое количество АФК, но и в том, и в другом случае АФК необходимы для реализации иммунного ответа [209] и сигналинга [2, 222, 248]. Оксид азота (II) оказывает ингибирующее действие на активность НАДФН-оксидазы [125].

Механизм одноэлектронного восстановления кислорода необходим для клетки. Молекулярный кислород обладает достаточно большой кинетической инертностью по отношению к органическим веществам за счёт двух неспаренных электронов с одинаковыми спинами [18, 236], из-за чего молекула  $O_2$  не может принять одновременно два электрона. Этим объясняется его высокая концентрация в окружающей среде и почему органические вещества, в большинстве своём являющиеся донором пары электронов, не подвергаются сиюминутному окислению. Однако эффективное использование кислорода возможно при последовательной передаче электронов по одному. В биологических системах такой процесс осуществляется благодаря ферментам оксидазам [18], таким как ЦО. Кроме того, большинство компонентов ЭТЦ имеют способность к передаче только одного электрона, поэтому термодинамически одноэлектронное восстановление кислорода в электрон-транспортной цепи митохондрий возможно на всех участках [153, 207].

Экспериментально доказана способность производить АФК для следующих ферментов митохондрий: комплексы I, II, III, дигидролипоилдегидрогеназа, НАДФН-оксидаза, моноаминоксидаза [18, 207, 278]. Однако вклад в общее количество производимых митохондрией АФК неодинаков между её компонентами. Реакция может происходить как с участием коферментов, так и с участием железа гемсодержащих ферментов или железосерных центров [18]. Наиболее активен путь превращения кислорода в супероксид в комплексе III, благодаря которому АФК могут образовываться как в матриксе, так и в межмембранном пространстве, откуда могут выходить в цитозоль [207]. Комплекс II играет роль как самостоятельного продуцента свободных радикалов, так и донора электронов для комплексов I и III, следовательно, вносит как прямой, так и косвенный вклад в производство АФК [201].

Супероксид спонтанно или ферментативно может взаимодействовать с различными молекулами и радикалами, находящимися в среде, и тем самым давать начало другим реакционноспособным веществам [228].

Некоторые реакции образования АФК с участием супероксида:



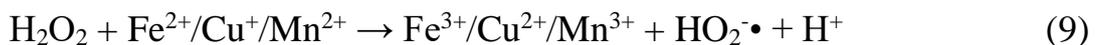
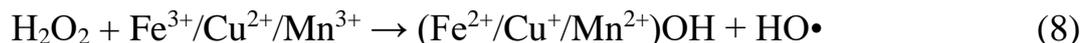
Полученный в реакции (2) гидропероксильный радикал более стабилен, чем супероксид, и во много раз более реакционноспособен и проникаем для биологических мембран [236]. Ещё одну реакцию превращения супероксида в пероксид водорода катализирует супероксиддисмутаза, экспрессия которой индуцируется в ответ на окислительный стресс [278].

Фермент супероксиддисмутаза (СОД, SOD, от англ. superoxide dismutase, КФ 1.15.1.1) является металлопротеином, у млекопитающих представлен тремя изоформами (SOD1, SOD2, SOD3). СОД1 и СОД3 образуют комплекс с медью и цинком, СОД2 – с марганцем. Первый изофермент обнаруживается в цитоплазме эукариот и межмембранном пространстве митохондрий, второй – матриксе митохондрий, а третий – является внеклеточной формой [278]. СОД относится к ферментам антиоксидантной системы клеток и обеспечивает утилизацию супероксида с образованием пероксида водорода и молекулярного кислорода:



Замещение марганца железом вследствие истощения его запасов, например, при старении, приводит к изменению функции СОД, которая в этих условиях становится прооксидантной пероксидазой [263].

Образующийся в результате дисмутации супероксида пероксид водорода может продолжить участие во взаимопревращении АФК:



Второй путь утилизации супероксида решает проблему потери кислорода и электронов и исключения их из участия в окислительном фосфорилировании. Продуцируемый комплексом III в межмембранном пространстве  $\text{O}_2^{\cdot-}$  способен восстанавливать цитохром c [278], который далее передаёт электроны на

терминальный участок ЭТЦ (Рисунок 1), возвращая их, таким образом, в процесс энергопродукции.

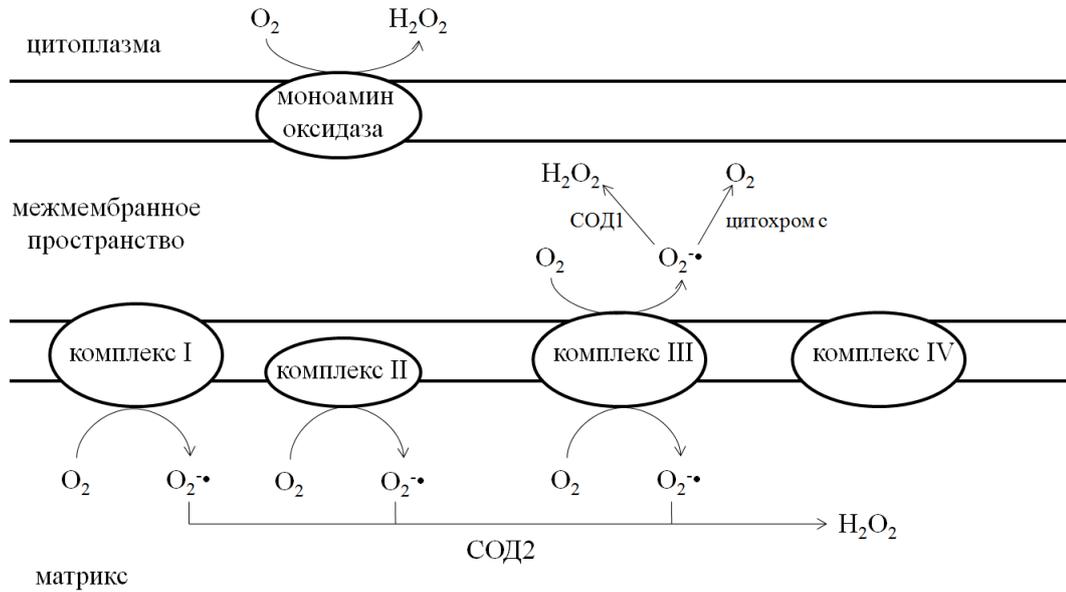


Рисунок 1 – Участки образования супероксида в дыхательной цепи и пути его утилизация (адаптировано по Turrens, J.F., 2003 [278])

Митохондрии являются основными поставщиками АФК в большинстве клеток. До 2% [207] всего поступающего  $O_2$  переходит в АФК, и по мере нарастания уровня кислорода при гипероксии количество его активных форм пропорционально возрастает [278]. Доказано, что окислительный стресс при инфаркте миокарда от митохондрий распространяется на эндоплазматический ретикулум [204]. Несмотря на то, что супероксид считается побочным продуктом ЭТЦ, для регуляции метаболизма его присутствие оказывается необходимым. Окислительный стресс возникает, когда количество АФК превышает антиоксидантную способность клетки [235, 272].

Таким образом, изучение метаболизма митохондрий, их реакции на изменение условий, поиск модуляторов их активности и оценка участия в передаче сигналов в клетке является приоритетным современным направлением научных изысканий. Двойственная роль этих органелл – «пускового механизма» и «жертвы» патогенеза – ещё не определена до конца, и существующие теории могут быть дополнены экспериментальными данными.

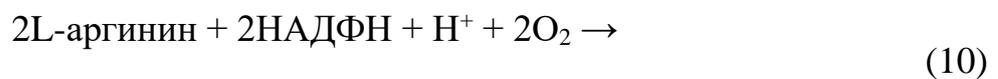
## 1.2. ОКСИД АЗОТА (II) И ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

### 1.2.1. Синтез оксида азота (II) в биологических системах

Оксид азота (II) из-за наличия неспаренного электрона является свободным радикалом – NO•. С момента его открытия в качестве эндотелиального фактора расслабления сосудов млекопитающих [265] изучение его эффектов распространяется всё глубже в клетку и список функций постоянно пополняется. В последнее время внимание учёных направлено на терапию коронавирусной инфекции и предотвращения тяжёлых последствий этого заболевания, основываясь на протекторном действии NO [113, 132].

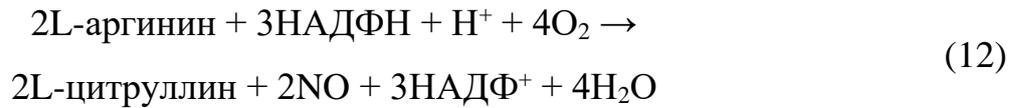
Преимущественно синтез оксида азота (II) осуществляется ферментом NO-синтазой (NOS, КФ 1.14.13.39), представленной в организме человека несколькими изоформами: nNOS (NOS1) – нейрональная, iNOS (NOS2) – индуцибельная, eNOS (NOS3) – эндотелиальная. Отдельно выделяют митохондриальную синтазу оксида азота mtNOS [278]. Хотя изоферменты широко экспрессируются в организме, своё название они получили по типу клеток, в которых впервые были обнаружены. NOS1 и 3 являются конститутивными Са-зависимыми белками, продуцирующими небольшое фоновое количество оксида азота (II), в то время как NOS2 отличается гиперпродукцией NO и не регулируется кальцием [203]. В ответ на различные стрессорные факторы экспрессия этих ферментов может меняться, что вызывает колебания содержания оксида азота (II). Например, у грызунов, нокаутных по eNOS, наблюдалось лишь незначительное снижение NO в кровотоке, что объясняется повышенной экспрессией nNOS в этих условиях [211].

Источником атомов азота является гуанидиновая группа L-аргинина, атомов кислорода – молекулярный кислород, а донором протонов выступает НАДФН. Образование оксида азота идёт в две стадии:





Суммарно схему реакции выглядит следующим образом:



L-цитруллин вовлекается в реакции образования мочевины, где под действием аргининосукцинатсинтетазы (ASS, от англ. argininosuccinate synthetase), а затем аргининосукцинатлиазы снова превращается в L-аргинин, организуя, таким образом, своеобразный цикл «L-цитруллин-NO» [269].

По своей структуре NO-синтаза является гомодимером, где один домен выполняет функцию оксигеназы, окисляя аргинин, а второй – редуктазы, переносящей электроны [152]. Оксигеназный домен содержит гем, подобный P450, и сайты связывания тетрагидробиоптерина (Н4-БП) и аргинина; редуктазный домен содержит флавиновые коферменты – ФМН и ФАД, и сайт связывания НАДФН. Эффективному переносу электронов и сопряжению реакций способствует стабилизация доменов комплексом Са-кальмодулин и дополнительный кофермент Н4-БП в оксигеназном домене. Связывание кальция регулируется фосфорилированием / дефосфорилированием остатков тирозина в положении в цепях NOS.

Поскольку одномоментно возможен перенос только одного электрона и реакция проходит ступенчато, синтаза оксида азота способна к продукции АФК [254]. Этот эффект устраняется в присутствии достаточного количества L-аргинина [192] или ингибитора NO-синтазы [265]. Способность NOS образовывать на промежуточной стадии супероксид рассматривается, как потенциально возможное участие этого фермента в окислении ксенобиотиков. Однако механизм образования NO может быть нарушен, если при этом наблюдается повышенная активность СОД, которая с высокой скоростью превращает супероксид, препятствуя его участие в реакции [221].

### 1.2.2. Регуляция синтеза оксида азота (II) L-аргинином

Естественный субстрат для синтеза оксида азота (II) L-аргинин является протеиногенной аминокислотой, которая участвует в синтезе мочевины, креатина

и полиаминов [4], оказывает протекторное действие при различных патологических состояниях [37, 134], так как индукция синтеза оксида азота (II) приводит к улучшению состояние тканей за счёт увеличения микроциркуляции крови [29]. L-аргинин поступает с пищей или синтезируется *de novo* в орнитиновом цикле. Перенос аминокислоты в клетки осуществляется с помощью катионного транспортёра аминокислот CAT-1, CAT-2 и CAT-3 (CAT, от англ. cationic amino acid transporter) [111]. В метаболизме этой аминокислоты участвуют несколько ключевых ферментов: ASS [180], NOS и аргиназа (ARG, от англ. arginase). Причём последние два фермента конкурируют за возможность использовать субстрат, что существенно влияет на его биодоступность и продукцию NO. При этом S-нитрозилирование аргиназы с помощью NO способствует её активации [93], а S-нитрозилирование остатков цистеина синтазы оксида азота приводит к NO-зависимому аутоингибированию eNOS и nNOS, но не iNOS [279], что можно рассматривать, как способ сохранения баланса оксида азота (II).

Экспериментально подтверждено, что экзогенный L-аргинин вызывает дозозависимое повышение количества оксида азота (II) в крови [283] и увеличивает экспрессию eNOS [187] и iNOS. Причём эффект имеет чёткую зависимость от способа получения аминокислоты. Введение аргинина в кровотоки с помощью инъекций приводит к быстрому нарастанию NO в крови и позволяет достичь более высокой пиковой концентрации, чем получение аминокислоты *per os*, поскольку в первом случае аргинин сразу становится субстратом для NOS, а во втором – доступность субстрата ограничена скоростью всасывания и действием аргиназы печени. Предшественник NO – L-аргинин рассматривают в качестве биологически активной добавки, применяемой для решения проблем половой дисфункции у мужчин [64, 133].

#### 1.2.2.1. Другие источники NO

Окисление L-аргинина не единственный способ получения оксида азота (II). Восстановление высших оксидов азота с образованием NO имеет существенное значение в поддержании его уровня в клетке [119]. Нитраты и нитриты плазмы

крови, поступающие в организм с пищей, особенно растительного происхождения, представляют собой важный источник оксида азота (II). Известно, что одноэлектронное восстановление  $\text{NO}_2$  до  $\text{NO}$  усиливается при ацидозе и гипоксии [131].

Реакции опосредованы электронодонорными системами, содержащими никотинамидные или флавиновые коферменты, или в присутствии гемсодержащих белков. Ксантиноксидаза и ЦО митохондрий обладают нитритредуктазной активностью [199]. Экспериментально подтверждено, что участие комплекса IV в синтезе  $\text{NO}$  усиливается в условиях снижения потока электронов [119].

Восстановление нитритов и нитратов возможно и неферментативно, например, с участием аскорбиновой кислоты. Дезоксимиоглобин и дезоксигемоглобин также могут оказаться эффективными источниками оксида азота (II) в условиях кислорододефицита, когда функция NOS снижается [211, 265]. Реакция восстановления нитритов гемоглобином протекает с образованием нитрозильного комплекса железа [6, 123], перенос электронов сопряжён с включением протона водорода в образующийся метгемоглобин [265], что служит обоснованием, почему продукция  $\text{NO}$  путём восстановления высших оксидов азота усиливается при ацидозе. Образующиеся комплексы железа гемсодержащих белков и оксида азота выполняют функцию внутриклеточного пула  $\text{NO}$  [280].

### 1.2.2.2. Ингибирование синтазы оксида азота

Экспериментально дефицит  $\text{NO}$  моделируют путём введения ингибиторов синтазы оксида азота, которые могут быть как селективными по отношению к изоформам NOS, так и неселективными [13]. К ингибиторам iNOS относятся S-метилизотиомочевина, L-амино-S-метилизотиомочевина, 4-амино-тетрагидробиоптерин, nNOS – 7-нитроиндазол [149].

Большое распространение получил неселективный ингибитор NOS метиловый эфир N( $\omega$ )-нитро-L-аргинина (L-NAME, от англ. N( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester), который используют в экспериментах для моделирования гипертензии и изучения эффектов дефицита оксида азота (II). L-NAME является

конкурентным ингибитором, замещая L-аргинин в активном центре синтазы оксида азота (Рисунок 2). Однако связывание аналога аминокислоты обратимо, и ингибирующий эффект снимается при накоплении L-аргинина в среде.

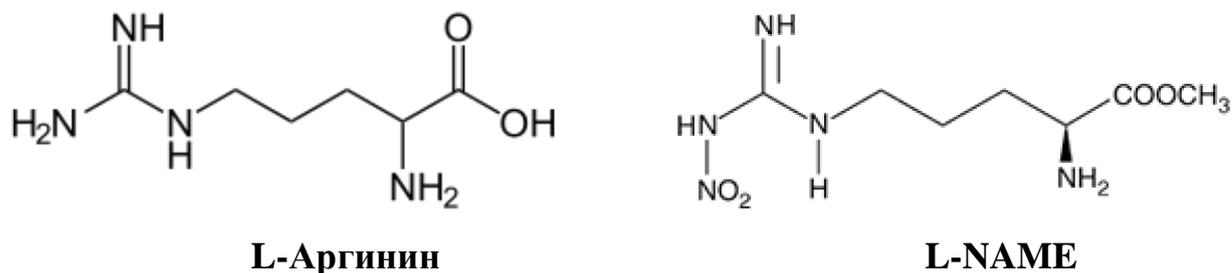


Рисунок 2 – Структурные формулы L-аргинина и метилового эфира N( $\omega$ )-нитро-L-аргинина

В физиологических условиях регуляция продукции этого газотрансмиттера возможна несколькими путями. Так, каудальным отделом эпидидимиса продуцируется белковый фактор покоя (QF, от англ. quiescence factor), ингибирующий активность NOS, поддерживая низкую внутриклеточную концентрацию NO и его нижестоящих эффектов, что обеспечивает снижение подвижности сперматозоидов [83]. По-видимому, это предохраняет половые клетки от преждевременной активности, которая может оказаться губительной. В подтверждение этому в нескольких исследованиях доказана эффективность NO-дефицитной терапии для восстановления функций сперматозоидов [171].

Высказываются предположения, что дефицит NO, возникающий при митохондриальных дисфункциях, опосредует патогенез. Уменьшение количества оксида азота (II) имеет несколько причин. Во-первых, дисбаланс продукции АТФ нарушает функции клетки по производству ферментов, что приводит к снижению экспрессии, в том числе ферментов цикла «L-цитруллин-NO». Во-вторых, изменение метаболизма митохондрий может оказать сильное влияние на продолжительность существования самой молекулы оксида азота (II): повышение продукции активных форм кислорода провоцирует образование с участием NO активных форм азота, нарушение работы ЭТЦ приводит к тому, что ЦО быстрее рекрутирует оксида азота (II). В-третьих, повышение АФК может способствовать

усилению протеолиза, что, в свою очередь, приведёт к повышению концентрации асимметричного диметиларгинина (АДМА) – продукта непрерывной модификации белков – метилированного L-аргинина, который является естественным ингибитором NOS [111].

### **1.2.3. Эффекты оксида азота (II) на уровне субклеточных структур и целого организма**

По физическим свойствам NO является липофильной молекулой, что позволяет ему проникать в клетку и субклеточные структуры путём простой диффузии [149]. Оксид азота (II), являясь свободным радикалом, вступает в реакции только с частицами, имеющими неспаренный электрон. Но, несмотря на это, внутриклеточные мишени и эффекты оксида азота (II) весьма многочисленны: NO быстро связывается с металлами, особенно с железом гема или железосерных центров белков [176, 269, 280], участвует в S-нитрозилировании белков по остатку цистеина [7], передаче сигналов для регуляции экспрессии генов [268], опосредует нейронную коммуникацию.

Основной эффект оксид азота (II), как фактор расслабления сосудов, реализует через растворимую гуанилатциклазу, повышая её активность в 100 раз за счёт связывания с гемом в активном центре фермента [77, 265]. Увеличение уровня цГМФ инициирует различные эффекты в клетке, в том числе резкое снижение количества кальция в цитоплазме за счёт его захвата в кальциевые депо в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. Это делает невозможным активацию актина и миозина, и в сочетании с повышенным при этом поступлением калия наступает гиперполяризация мембраны, расслабление гладких мышц и расширение просвета сосуда [149]. Основываясь на исследованиях участия NO в регуляции сосудистого тонуса, его называют важным диагностическим маркёром развития патологических процессов, а оценка уровня оксида азота (II) в крови имеет прогностический характер [52].

Оксид азота (II) играет немаловажную роль в синтезе, секреции и подвижности сперматозоидов, участвует в акросомной реакции, регулирует

брачное поведение, ответственен за эрекцию полового члена и сократительную способность семенных пузырьков [194]. Кроме того, оксид азота (II) регулирует гормональный статус, снижая продукцию тестостерона [206], в то время как при действии ингибиторов NOS синтез гормона усиливается [89].

NO обладает двойственным эффектом анти- и прооксиданта, по-видимому, в зависимости от его количества, длительности воздействия источников его синтеза, таких как L-аргинин, и сопутствующих факторов. Как антиоксидант NO замедляет перекисное окисление липидов, регулирует участие металлов в реакциях, противодействует воспалению, ингибируя циклооксигеназу [149]. При высоких концентрациях обладает цитотоксическим действием [35], которое основано как на избыточном влиянии на металлсодержащие ферменты [272], S-нитрозилировании тиоловых групп митохондриальных белков [203], что вызывает снижение энергопродукции, открытие МРТР, высвобождение в цитозоль апоптогенных факторов и цитохрома с и запускает митохондриальный путь апоптоза; так и на образовании высоко реакционноспособных молекул, называемых активными формами азота (АФА).

### 1.2.3.1. Активные формы азота

Функционирование синтазы оксида азота может оказаться весьма токсичным, так как сопутствующее образование NO и супероксида способствует образованию пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ) – сильного окислителя, обладающего высокой нитрозилирующей способностью [203, 228, 265].



Пероксинитрит в водных средах находится в равновесии с соответствующей пероксиазотистой кислотой ( $\text{ONOOH}$ ). Хотя отмечается, что кислота более реакционноспособна, при физиологическом pH равновесие сильно смещено в сторону аниона [99].

Пероксинитрит реагирует с другими молекулами чуть медленнее, чем оксид азота [98], может проникать через мембрану диффузно или через ионные каналы. Это даёт основание предположить, что влияние АФА могут иметь отложенные во времени эффекты и распространяться гораздо дальше от места продукции.

В экспериментах на грызунах показано, что нитрование пероксинитритом митохондриальной СОД [193] приводит к снижению её активности и сопутствующему повышению перекисного окисления липидов [127]. Кроме того, в присутствии NO и АФА ингибированию подвергаются и митохондриальные комплексы электрон-транспортной цепи [176], креатинкиназа, ферменты цитратного цикла [95], а также увеличивается проницаемость митохондриальной поры [149], что способствует развитию вторичной митохондриальной дисфункции. Таким образом, протекторному эффекту активации eNOS могут противодействовать потенциально вредные эффекты NO, вследствие его избыточного синтеза iNOS [283].

Нитроксильный анион  $\text{NO}^-$  также относится к АФА, обладает свойствами эндотелиального фактора расслабления сосудов, реагирует с оксидом азота (II) с образованием сильного одноэлектронного окислителя гипонитритного радикала  $\text{ONNO}^-$  [98].

### 1.2.3.2. Дефицит оксида азота (II)

Моделирование дефицита NO помогает установить истинную роль этой молекулы для физиологии организма. Прежде всего, снижение продукции NO отражается на регуляции кровотока [116], что может иметь решающее значение для мышечной ткани во время работы, ишемическом повреждении [111], а также маточно- и фетоплацентарного кровотока [135].

Однако обнаруживаются и другие эффекты, сопряжённые с нарушением продукции оксида азота (II). Так, в эксперименте на новорождённых крысах дефицит NO стал причиной развития шизофрении, а развитие окислительного стресса, опосредованное недостаточностью оксида азота (II) – причиной нарушения функций митохондрий [30]. Другое исследование показало анальгезирующий эффект экспериментального дефицита оксида азота (II) [61]. В эксперименте на eNOS-нокаутных мышцах показано снижение глутамин в лобной коре, гиппокампе и парагиппокампальной области [136]. Исследование нейроэндокринной регуляции раннего полового созревания на nNOS-дефицитных животных доказывает участие NO в развитии мозга [213]. С другой стороны,

дефицит NO может быть спровоцирован снижением продукции тестостерона, что приводит к эндотелиальной и эректильной дисфункции [158].

Несомненно, оксид азота (II) является одной из важных молекулярных регуляторов, продукция которой в организме находится под строгим контролем, а вмешательство в этот процесс может иметь терапевтический или токсический эффект. Изучение роли NO может стать ключом к пониманию переключения путей метаболизма в различных физиологических и патологических условиях.

### **1.3. ДЕФИЦИТ КИСЛОРОДА И ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

#### **1.3.1. Гипоксия: основные экспериментальные модели**

Гипоксия – широкое понятие, характеризующее состояние организма, органа или отдельной ткани, которое возникает при дефиците кислорода, нарушении его транспорта или использования клеткой. Основу классификации составляют причины возникновения гипоксии: гипоксическая (непосредственное снижение содержания кислорода во вдыхаемом воздухе), дыхательная (нарушение работы лёгочной системы), гемическая (нарушение связывания кислорода с гемоглобином, анемия), циркуляторная (нарушение работы системы кровообращения), тканевая (нарушение использования кислорода клетками) [55, 59]. Среди перечисленных видов только гипоксическая является экзогенной, в связи с чем различают гипобарическую и нормобарическую гипоксию. По длительности воздействия также выделяют острую и хроническую [129].

Последующая за гипоксией реоксигенация может оказаться ещё более губительной для клеток, чем сам по себе дефицит кислорода [240]. Нарушение кислородного гомеостаза сопровождается и осложняет целый ряд патологических состояний лёгочной системы [1, 60, 69, 118], головного мозга [92], почек [163], репродуктивной системы [128, 130, 165, 169, 226] и других систем органов и тканей. Неодинаковая восприимчивость к гипоксии различных тканей и органов млекопитающих обусловлена, прежде всего, их функциональной активностью, что влияет на характер кровоснабжения и распределение кислорода [21].

Наиболее чувствительными к кислорододефициту называют миокард, почки, печень и в особенности – головной мозг. Стволовые клетки, семенные пузырьки и эпидидимис следует отнести к органам, имеющим среднюю чувствительность к гипоксии, так как напряжение кислорода в этих тканях даже в нормальных физиологических условиях невысоко. Причём хвост придатка яичка в этой классификации занимает место менее чувствительного участка по сравнению с головкой эпидидимиса [205].

Для изучения влияния кислорода и молекулярных механизмов адаптации к его дефициту разработано несколько моделей гипоксии на лабораторных животных. Одним из часто используемых исследовательских объектов являются аутбредные крысы, фенотипически этих животных можно разделить на высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии [66], что влияет на выбор методики моделирования состояния кислорододефицита. Как и самих видов гипоксии, методов экспериментального моделирования также много.

Большое распространение получили модели гипобарической гипоксии [41]: острой и хронической [12]. Успех применения этих экспериментальных методик заключается в относительной лёгкости и хорошей воспроизводимости. Однако в естественной среде человек испытывает воздействие гипобарического снижения кислорода во вдыхаемом воздухе в исключительных ситуациях: пребывание в условиях высокогорья [142], полёты на большой высоте [250]. Чаще человек сталкивается с нормобарической гипоксией при нахождении в плохо вентилируемых помещениях, общественном транспорте, личном транспорте, оказавшись в дорожном заторе, при этом бессимптомно испытывая воздействие кратковременного нарушения газообмена, сопровождающегося как гипоксией, так и гиперкапнией, во время апноэ во сне [100]. К тому же модели гипобарической гипоксии не могут быть совершенными, т.к. пониженное давление само по себе способно оказывать влияние на организм [270].

Методики моделирования острой гипоксии в основном направлены на определение процента выживших в эксперименте по содержанию животных в герметичной камере в течение определённого отрезка времени [41, 71], что имеет

существенный недостаток с точки зрения биоэтических норм – высокую смертность животных [86]. К тому же, подобные модели, хотя и приводят к изменениям кислотно-основного равновесия [71] и состава крови у испытуемых, из-за слишком малой продолжительности (минуты) не могут вызвать устойчивого метаболического ответа организма в виде активации генов и начала синтеза ферментов (часы).

Зафиксировать изменения на субклеточном и молекулярном уровне можно при применении моделей хронической гипоксии, как гипобарической, так и нормобарической. Традиционно условия экспериментов при этом предполагают содержание животных в герметичной камере фиксированное количество времени [41] один или несколько раз в день в течение нескольких дней. Однако учёт вариабельности животных по устойчивости к дефициту кислорода, массе, физической активности в ходе эксперимента, скорости адаптации сводится к минимуму.

Следующим критерием, помимо давления и длительности, на который могут быть ориентированы методики, является уровень кислорода во вдыхаемой газовой смеси. Пребывание человека в условиях гипоксии при уровне кислорода менее 12% [160] является критическим для здоровья, вызывая необратимые изменения функционирования организма вплоть до летального исхода. Кратковременное использование газовых смесей, содержащих только 10%  $O_2$ , применяются в исследованиях для формирования адаптации к гипоксии [2], снижение уровня кислорода на 50% относительно содержания в воздухе является оптимальным режимом для формирования толерантности к дефициту кислорода [39, 160]. Для достижения более естественных условий эксперимента модели гипоксии дополняют ещё одним параметром – уровнем углекислого газа. Известно, что гиперкапния, развивающаяся вследствие повышения  $CO_2$  во вдыхаемом воздухе, является не менее сильным стимулом для метаболических изменений, чем снижение  $O_2$  [14].

Таким образом, можно заключить, что большое количество экспериментальных моделей гипоксии оправдано с точки зрения выбора конечной

цели, достижению которой и будет способствовать та или иная методика. Однако описанные подходы не лишены недостатков и требуют доработки и усовершенствования.

### **1.3.2. Механизмы адаптации к дефициту кислорода**

Недостаток кислорода для большинства клеток сопровождается снижением продукции АТФ [150] из-за нарушения работы электрон-транспортной цепи митохондрий [38] и переключением на потребление углеводов в качестве единственного источника энергии. Некоторые организмы способны резко сокращать расход АТФ в условиях гипоксии, например, за счёт снижения работы ионных каналов [208]. Однако запасы углеводов ограничены, а снижение метаболической активности тканей может привести к нарушению функции органа и гибели организма. Поэтому ни одна стратегия адаптации не может быть в полной мере эффективной, и гипоксия, так или иначе, оказывает деструктивное действие.

#### **1.3.2.1. Реакция электрон-транспортной цепи на гипоксию**

Рассматривая вопрос о функционировании электрон-транспортной цепи в условиях гипоксии, следует указать, что константа Михаэлиса по кислороду для ЦО крайне низка ( $10^{-8}$ - $10^{-6}$ ) [40], что говорит о высоком сродстве этого фермента к  $O_2$  и объясняет, почему продукция АТФ митохондриями не останавливается полностью при депривации кислорода. Животные, постоянно обитающие в среде с пониженным содержанием кислорода, эволюционно приобрели форму СОХ, обладающую повышенным сродством к  $O_2$ . Следовательно, снижение активности терминальной оксидазы ЭТЦ, вследствие недостатка субстрата, ожидаемо только при очень низком содержании кислорода в клетке, что бывает в условиях глубокой и/или длительной гипоксии [94]. Вероятно поэтому, митохондрии остро нуждаются в регуляторах активности ферментов электрон-транспортной цепи для поддержания кислородного гомеостаза при недостаточном его поступлении. Одним из них является оксид азота (II), который в условиях нормоксии быстро окисляется до нитритов, но стабилизируется при кислорододефиците [170, 252]. В

результате этого NO участвует в перераспределении  $O_2$  в клетке, направляя его в другие кислородзависимые реакции [239], блокируя работу ЦО посредством связывания с гемсодержащим центром [176]. Молекулярный механизм эффектов оксида азота (II) и его роль при адаптации к дефициту кислорода активно рассматривается в современной исследовательской практике [203, 212].

Полная потеря активности ЦО наблюдается на третьей (терминальной) стадии так называемой биоэнергетической гипоксии [21, 40]. Сам термин биоэнергетическая гипоксия [55] является отражением механизма тканевой гипоксии, который характеризует этапность нарушения энергопродукции митохондриями [40]. На начальной стадии кислорододефицита происходит увеличение синтеза АТФ за счёт активации НАДН-дегидрогеназы. Но при усугублении тяжести или длительности гипоксии наблюдается угнетение функций I комплекса ЭТЦ, следствием чего является снижение продукции энергии и накопление восстановленного НАД, а также повышение активности комплекса II и использования сукцината в качестве источника энергии. Это вторая стадия развития биоэнергетической гипоксии, которая проявляется компенсаторной активацией альтернативных путей окисления субстратов, необходимой для поддержания мембранного потенциала. И лишь терминальная стадия, когда кислорододефицит настолько выражен, что ЦО инактивируется, характеризуется потерей градиента электрохимического потенциала и высокой степенью деэнергизации клетки [21, 40].

Повышение соотношения НАДН/НАД<sup>+</sup> на стадии компенсации способствует повышению продукции АФК и угнетению метаболических процессов в митохондриях за счёт уменьшения активности НАД-зависимых ферментов: пируват- и 2-оксоглутаратдегидрогеназных комплексов, изоцитрат- и малатдегидрогеназы. За этим следует инактивация работы малат-аспартатного челнока, в результате чего повышается НАДН в цитоплазме клетки, а в митохондриях накапливается фумарат. Последний используется для продукции сукцината путём реверсии работы СДГ [256, 258]. Кроме того, инверсии СДГ способствует оксид азота (II) [97].

Изменение баланса НАДН/НАД<sup>+</sup> в цитоплазме имеет регуляторное значение. Во-первых, активируется ЛДГ, поддерживающая высокое содержание окисленного НАД для ускорения реакций гликолиза. Важность этой реакции подтверждается наблюдаемым повышением экспрессии ЛДГА при гипоксии [90, 166]. Во-вторых, НАД участвует в регуляции активности гипоксией индуцируемого фактора [216].

### 1.3.2.2. Фактор, индуцируемый гипоксией

Открытие в начале 90-х годов XX века фактора, индуцируемого гипоксией (HIF, от англ. hypoxia-inducible factor), стало началом исследований в области понимания механизмов адаптации клеток к дефициту кислорода. Как было установлено, этот транскрипционный фактор является высококонсервативным гетеродимерным белком, представленным тремя формами: HIF1 отличается чувствительностью к острой или интермиттирующей гипоксии, в отличие от 2 и 3, повышение которых отмечается при длительных видах кислорододефицита [186]. Мономеры HIF, названные  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами (HIF1 $\alpha$  и HIF1 $\beta$ ), различаются, прежде всего, по чувствительности к содержанию кислорода. При физиологическом уровне оксигенации остатки пролина  $\alpha$ -субъединицы подвергается гидроксигированию с помощью пролилгидроксилазы (PHD, от англ. prolyl hydroxylase domain) [178]. С этой ковалентной модификации начинается протеасомный путь деградации HIF1 $\alpha$ , где гидроксигирование остатков пролина служит мишенью для присоединения белка опухолевого супрессора фон Хиппеля-Линдау и облегчения убиквитинирования. Активность  $\beta$ -субъединицы не зависит от количества кислорода: HIF1 $\beta$  синтезируется конститутивно и необходим для транспорта HIF1 $\alpha$  в клеточное ядро.

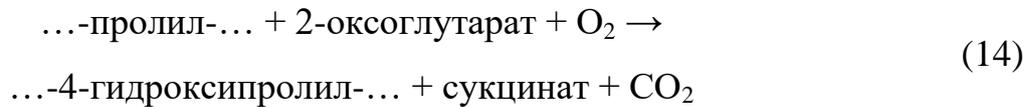
В условиях, когда  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы HIF могут существовать достаточно долго, чтобы образовать димер, транскрипционный фактор проникает в ядро, где связывается с HIF-чувствительными элементами (HRE, от англ. hypoxia-response elements) в ряде генов, индуцируемых гипоксией, регулируя их экспрессию и тем самым способствуя адаптации клетки к дефициту кислорода [253]. Кроме того,

показано, что HIF может быть ассоциирован с митохондриями, что важно для быстрого реагирования на гипоксические условия [103, 140].

Хотя гипоксией индуцируемый фактор повсеместно продуцируется, количественно его содержание в тканях различается. Например, каудальный отдел эпидидимиса имеет более высокий уровень экспрессии HIF, по сравнению с другими функциональными отделами придатка яичка [139].

### 1.3.2.3. Пути регуляции активности HIF

Выделяют так называемые канонический (кислородзависимый) и неканонический (кислороднезависимый) пути активации HIF. Ключевую роль в обоих случаях играет регуляция активности пролилгидроксилазы. PHD, катализирующая превращение HIF1 $\alpha$ , использует в реакции 2-оксоглутарат, кислород, двухвалентное железо и аскорбиновую кислоту. Гидроксилирование пролина по 4 атому углерода происходит в пределах так называемых кислородзависимых доменов деградации в положении 402 и 564 [143]. Реакция протекает по схеме:



Известно, что константа Михаэлиса по кислороду для пролилгидроксилазы гипоксией индуцируемого фактора намного выше, чем у других ферментов этой группы [108], что характеризует его, как отличный биосенсор напряжения кислорода. В контексте этих фактов канонический путь активации HIF связан с резкой потерей активности PHD из-за уменьшения доступности субстрата и торможением реакции гидроксилирования  $\alpha$ -субъединицы.

Ещё одним способом контролировать HIF является ингибирующий его фактор (FIH, от англ. factor-inhibiting hypoxia-inducible factor). FIH – кислородзависимая аспарагинилгидроксилаза, которая обеспечивает снижение транскрипционной активности HIF при нормоксии [110] и даже в условиях развивающейся гипоксии, когда активность PHD уже снижена.

Механизм кислороднезависимой активации HIF более variabelен. Снижение активности пролилгидроксилазы возможно несколькими путями: при

повышении в среде аллостерического ингибитора PHD сукцината [256], например, при недостаточности СДГ или вследствие реверсии работы СДГ [97, 256, 258], при гиперпродукции активных форм кислорода [143], способствующих окислению железа в активном центре PHD из  $Fe^{2+}$  в  $Fe^{3+}$ . Свой вклад вносит и оксид азота (II) [251], который, с одной стороны, блокирует активный центр пролилгидроксилазы, связываясь с железом [143], а с другой стороны, нитрозилирует HIF1 $\alpha$ , что способствует стабилизации последнего [283]. Для HIF отмечаются такие же закономерности в снижении активности, хотя механизм этих явлений не изучен до конца [110].

Кроме уменьшения протеолиза кислородчувствительной субъединицы HIF повышение его активности в клетке возможно за счёт увеличения экспрессии этого белка в условиях гипоксии [216, 230]. Избыточное количество фактора транскрипции приводит к усилению обратной отрицательной связи и снижению экспрессии, что не происходит в режиме гипоксия/реоксигенация, при котором HIF экспрессируется, как при нормоксии [218].

Некоторые исследования сообщают о том, что нарушение баланса окислительно-восстановительной пары пируват/лактат имеет регуляторное значение для HIF. Так, накопление пирувата приводит к его активации [233], а дефицит лактата [264] стимулирует пролилгидроксилазу, что ведёт к деградации HIF.

#### **1.3.2.4. Эффекты гипоксией индуцируемого фактора**

Активный гетеродимер HIF способствует усилению экспрессии ферментов гликолиза – альдолазы А, ЛДГА, фосфофруктокиназы и пируваткиназы, транспортёров глюкозы и лактата [178], что в совокупности приводит к увеличению потребления углеводов, налаживает механизм получения энергии преимущественно гликолитическим путём и позволяет клетке быстро выводить повышенное количество молочной кислоты, образующейся при этом. В отношении митохондриальных ферментов HIF снижает скорость сборки железосерного кластера комплекса I ЭТЦ [156], индуцирует киназу пируватдегидрогеназы [178], что приводит к снижению активности этих

ферментов, торможению поглощения пирувата митохондриями и, как следствие, снижению продукции АФК и потребления кислорода митохондриями, повышению напряжения  $O_2$  в клетке [267]. HIF модулирует соотношение экспрессируемых форм ЦО, увеличивая продукцию второй изоформы COX4I2 [154], что приводит к снижению активности фермента. В условиях физиологической оксигенации COX4I2 преобладает в тканях лёгкого [159], в то время как COX4I1 – в тканях репродуктивной системы. Кроме того, HIF регулирует митохондриальную аутофагию, что способствует снижению продукции АФК и выживаемости клеток [200]. Эти механизмы можно рассматривать, как часть каскада развития биоэнергетической гипоксии и как приспособление к реоксигенации.

Помимо перечисленных очевидных мишеней, есть ряд белков, экспрессия которых также регулируется гипоксией индуцируемым фактором. Среди них, например, пролилгидроксилаза, за счёт активации которой обеспечивается быстрая ответная реакция на восстановление уровня кислорода [143]. Исследования на грызунах подтверждают необходимость быстрой деградации HIF1 $\alpha$ , как фактора, обеспечивающего нейропротекцию при реоксигенации. Также к гипоксия-чувствительным белкам можно отнести фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, от англ. vascular endothelial growth factor) [155, 217], нейрональную [167] и индуцибельную [31] изоформы синтазы оксида азота, следствием чего становится повышение NO в крови [K14]. Таким образом реализуется альтернативная стратегия адаптации к гипоксии, направленная на улучшение снабжения тканей кислородом путём ангиогенеза и усиленной вазодилатации [164].

Повышение продукции NO при гипоксии может быть полезным механизмом адаптации [144] не только с позиции усиления вазодилатации, но и с позиции сигналинга, так как, активируя гуанилатциклазу, оксид азота (II) индуцирует синтез фетального гемоглобина [183], который имеет большее сродство к кислороду. С другой стороны, HIF контролирует продукцию оксида

азота (II) из L-аргинина, снижая экспрессию ASS, ключевого фермента внутриклеточного синтеза этой аминокислоты [180].

Интересно, что для фактора, индуцируемого гипоксией, показана также негеномная роль. Его функции включают физическое взаимодействие с белками, локализованными в различных компартментах клетки, в том числе в митохондриях [103]. Связываясь с потенциал-зависимым анионселективным каналом 1 (VDAC-1) и белком теплового шока морталином на внешней мембране митохондрий HIF1 $\alpha$  способствует сохранению мембранного потенциала, благодаря чему препятствует выходу цитохрома c и апоптозу в условиях гипоксии [140]. Этот механизм рассматривается как ранний регулятор ответа на снижение уровня кислорода, тогда как транскрипционные эффекты HIF требуют времени для реализации. Фосфорилирование HIF, как и факторы среды или лекарственные средства, снижающие его транскрипционную активность, поддерживают ассоциацию HIF1 $\alpha$  с митохондриями [140]. Некоторые авторы высказывают предположения о способности HIF1 $\alpha$  проникать в матрикс, где он проявляет себя как регулятор транскрипции мтДНК [156].

Несмотря на положительный для адаптации к дефициту кислорода эффект активации HIF, его хроническое накопление негативно влияет на функцию большинства органов [217, 223, 274]. Возможно, это обусловлено снижением активности антиоксидантных ферментов, таких как СОД, и повышением продукции активных форм кислорода ферментом НАДФН-оксидазой, экспрессия которых регулируется HIF [230]. В исследованиях на грызунах, подвергшихся гипоксии, эти эффекты нивелировались эстрадиолом, который оказал протективное действие против АФК, подавляя при этом экспрессию HIF [137].

### **1.3.3. Патогенез при гипоксии. Факторы, влияющие на патогенез**

#### **1.3.3.1. Гипоксия и активные формы кислорода**

Состояние гипероксии ожидаемо приводит к увеличению количества активных форм кислорода, однако, гипоксия вопреки этой закономерности также характеризуется повышением продукции АФК [146, 278]. Этот парадокс до сих

пор не нашёл точного описания и активно изучается [58, 148, 175]. И хотя сейчас понятно, что АФК служат сигнальными молекулами, способствуют активации NIF и тем самым участвуют в адаптивном ответе при гипоксии [243], вопрос – почему в условиях дефицита субстрата становится больше его активных форм – остаётся нерешённым. Отметим, что производство АФК снижается только при глубокой гипоксии [245].

Предполагается несколько механизмов, объясняющих гиперпродукцию АФК при гипоксии. Во-первых, стабилизация гипоксией индуцируемого фактора при дефиците кислорода приводит к повышению экспрессии НАДФН-оксидазы, и, как следствие, к увеличению продукции активных форм кислорода [230]. Во-вторых, сильное влияние может оказывать изменение метаболизма митохондрий. Доказано, что в продукцию митохондриальных АФК особенно весомый вклад вносит комплекс III [148]. В условиях гипоксии всё ещё могут образовываться низкие концентрации оксида азота (II) [222]. Возможно, NO тормозит терминальную оксидазу ЭТЦ, из-за чего электроны «текут» в другую сторону и усиливается синтез АФК в ближайшем участке – комплексе III.

Являясь более реакционноспособными, чем молекулярный кислород, АФК способны к окислению органических биополимеров клетки, так как ненацеленно атакуют полисахариды, белки, липиды [238] и нуклеиновые кислоты. Кроме того, активные формы азота не менее значимы для этих реакций. Например, экспериментально подтверждено, что опосредованный железом окислительный стресс в эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга является ранней причиной их повреждения и разрушения гематоэнцефалического барьера при ишемическом инсульте [220]. А реакция окисления органических соединений в присутствии пероксида водорода и железа, именуемая реакцией Фентона (реакция 7), повсеместно применяется в лабораториях для моделирования окислительного стресса [79, 57, 196].

Развивающийся на фоне кислорододефицита окислительный стресс [19] характеризуется увеличением перекисного окисления липидов, как в самих сперматозоидах, так и в тканях, например, головке и хвосте эпидидимиса [284], а

также отмечается снижение активности ферментов антиоксидантной защиты клеток, таких, как СОД [128].

### 1.3.3.2. Окислительная модификация белков (ОМБ)

Активные формы кислорода и азота способны окислять функциональные группы аминокислот в составе белков с образованием карбонильных производных, что приводит к нарушению структурной организации белков и, как следствие, преждевременному протеолизу [7, 79]. Наличие разнообразных аминокислот в составе первичной структуры протеинов позволяет регистрировать несколько типов карбонильных производных – альдегиды и кетоны, основного или нейтрального характера, чем пользуются исследователи для оценки характера и степени повреждения белков [79]. Однако не всегда окисление белков рассматривается как патологический процесс. Большое значение имеет скорость окисления. Медленное превращение в большей степени соответствует посттрансляционной модификации и является частью механизма передачи сигналов в клетке. В противоположность этому быстрое окисление используется для обезвреживания белков, так как часто происходит бесконтрольно и вызывает нежелательные эффекты [151]. Высокая реакционная способность и обилие мишеней *in vivo* объясняют кратковременность существования АФК и приводят к выводу о том, что место синтеза АФК и большинство повреждений будут колокализованы [120]. В связи с этим, рассматривая окислительную модификацию белков, следует помнить, что, прежде всего, урон будет нанесён митохондриям.

Помимо атаки АФК, в гипоксических условиях отмечается усиление отщепления атома водорода в местах со слабой связью, например, в тиоловой группе цистеина, гидроксильной группе серина и треонина [120]. Эти реакции генерируют образование свободнорадикальных участков белковой цепи ( $R\bullet$ ), и через ряд превращений белковая молекула обогащается альдегидными и кетонными производными (Рисунок 3).

АФА, как и сам оксид азота (II), вызывают обратимое нитрозилирование белков по остатку цистеина, что приводит к изменению их функциональной

активности [7]. Модификация тиоловой группы с помощью АФА или АФК приводит к образованию сульфеновой кислоты, промежуточной формы, являющейся предшественником остальных изменённых форм цистеина в белках [106]. Такая модификация может быть как патологической, так и частью механизма передачи сигнала и служить инструментом регуляции активности белков наряду с фосфорилированием [179].

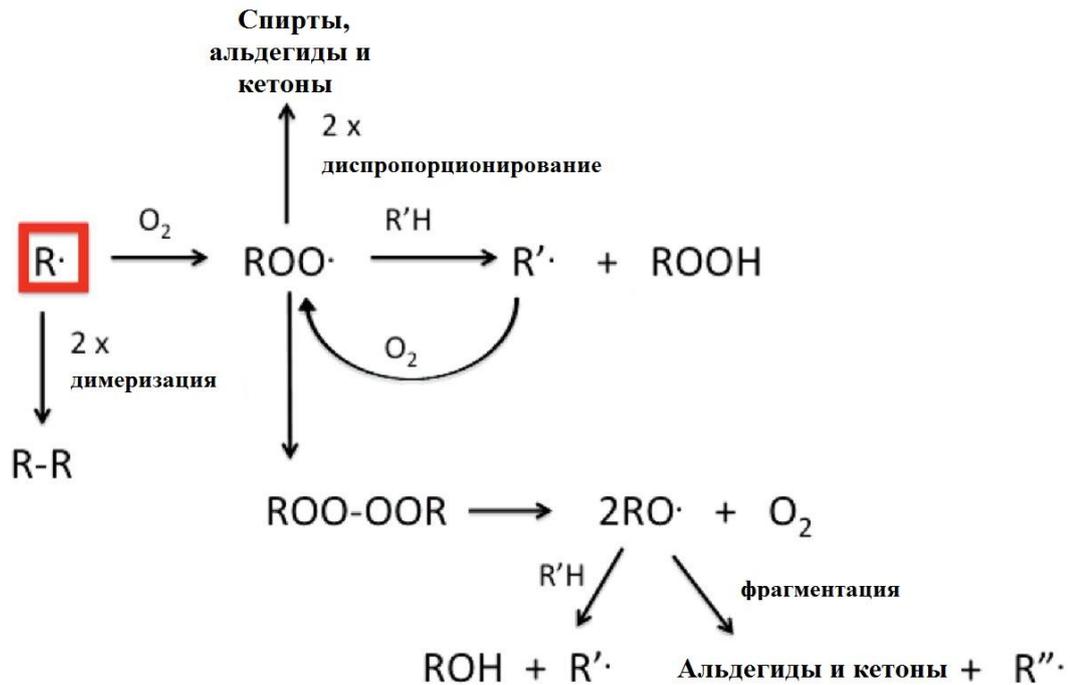


Рисунок 3 – Реакции окислительной модификации аминокислотных остатков белков (адаптировано по Davies, M.J., 2016 [120])

В исследованиях на мышах установлена взаимосвязь между количеством оксида азота (II) и его производных и количеством модифицированного цистеина в белках, причём снижение нитрозилирования приводит к ухудшению состояния [229]. Другое исследование доказывает кардиопротекторный эффект нитрозилирования субъединицы ND3 в комплексе I при ишемии/реперфузии [107]. Однако избыточное ингибирование ферментов ЭТЦ может привести к нарушению функций митохондрий [265].

Способность NO связываться с металлами также оказывает влияние на окисление белков, вызванное образованием АФК в реакции Фентона. Комплексы железа и оксида азота (II) оказываются более прочными, а реакции с их участием

замедляются [265]. К тому же такие комплексы способны к перехвату свободных радикалов, что в совокупности приводит к снижению окислительной модификации белков [6, 123].

### **1.3.3.3. Взаимное влияние гипоксии и продукции оксида азота (II)**

Как отмечалось ранее, оксид азота (II) оказывает адаптационное влияние при гипоксии, подавляя активность ЦО и митохондриальной поры; способствует вазодилатации и индукции синтеза фетального гемоглобина, снижению количества АФК и активации гипоксией индуцируемого фактора. Так как кислород является субстратом для синтеза оксида азота (II) его снижение неизбежно приведёт к замедлению продукции NO, но не полному прекращению этой реакции. Константа Михаэлиса по кислороду для синтазы оксида азота составляет  $30-40 \cdot 10^{-3}$ , что обеспечивает выход NO около 5-10 % от количества оксида азота (II), образующегося при нормоксии [222]. Экспериментально показано, что кислорододефицит стимулирует активность mtNOS [210]. Возможно, это часть механизма по защите клетки от последствий гипоксии, когда повышенная продукция NO в митохондриях способствует ингибированию ЦО, что обеспечивает в клетке сохранность кислорода и создаёт условия псевдонормоксии, в результате чего активация HIF не наступает [143].

Однако дефицит кислорода негативно влияет на синтез NO, что может оказаться решающим звеном патогенеза. Так, снижение количества NO возможно за счёт ускоренной деградации активными формами кислорода [63], что приводит не только к уменьшению эффектов оксида азота, но и образованию более агрессивных окислителей [265]. Подтверждено нарушение фосфорилирования остатков серина eNOS при гипоксии, что является причиной снижения активности этого фермента, и, как следствие, оксида азота (II) [85]. При этом отмечается увеличение экспрессии аргиназы [168] и понижение ASS [180], что приводит к снижению биодоступности L-аргинина.

Имеются свидетельства, что в отсутствие достаточного количества этой аминокислоты mtNOS «переключается» с производства NO на продукцию АФК, что усугубляет окислительный стресс [203, 265]. В связи с чем, экзогенное

получение L-аргинина рассматривается в качестве антигипоксической терапии. Некоторые исследования показывают стабилизацию активности ЛДГ в условиях гипоксии при назначении L-аргинина [214]. Его эффективность, как донора NO, в улучшении состояния описывается в исследованиях нарушений, сопряжённых с гипоксией [184], хронической обструктивной болезни лёгких [75], хронической маточно-плацентарной ишемии, почечной недостаточности, нарушений костной ткани [29], а также половой дисфункции [177].

#### **1.3.3.4. Участие сукцината в патогенезе и адаптации при гипоксии**

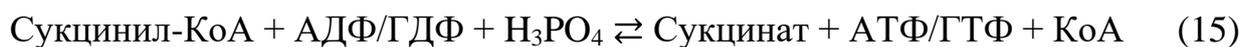
Сукцинат, образующийся в цикле трикарбоновых кислот, давно является предметом исследований, так как быстро вовлекается в энергетический обмен и проявляет свойства антиоксиданта и антигипоксанта [73, 81]. Кроме того, экзогенная янтарная кислота обладает антиоксидантным эффектом, способствуя снижению перекисного окисления липидов.

Можно рассмотреть несколько вариантов развития событий с участием сукцината. Янтарная кислота является донором электронов для ЭТЦ, что в условиях гипоксии, когда происходит угнетение функций комплекса I, может стать критически важным для поддержания энергопродукции митохондриями. Однако известно, что при этом увеличивается производство АФК комплексом I [207]. Также накопление сукцината снижает активность ЛДГА [88].

Поскольку СДГ, один из ферментов, использующих в качестве субстрата сукцинат, является комплексом ЭТЦ, его работа косвенно будет зависеть от доступности кислорода. Наблюдающаяся при гипоксии реверсия работы СДГ [95, 97, 256, 258], результатом чего становится накопление сукцината, может показаться неоправданной с точки зрения энергетического выхода. Однако накопление этого метаболита и выход его из митохондрий через переносчик дикарбоксилата SLC25A10 или VDAC способствует адаптации к гипоксическим условиям. С одной стороны, сукцинат, являясь аллостерическим ингибитором пролилгидроксилазы HIF1 $\alpha$ , способствует стабилизации этого транскрипционного фактора и реализации его эффектов [256, 257], что вызывает в клетках состояние псевдогипоксии [259]. С другой стороны, янтарная кислота проявляет себя как

паракринный мессенджер, являясь единственным, за небольшим исключением, лигандом рецептора, связанного с G-белками – SUCNR1 [74, 255]. Исследования эффектов активации этого рецептора показывают, что механизм действия реализуется через ингибирование аденилатциклазы [241], снижение активности протеинкиназы A и последующее высвобождение внутриклеточного кальция. Независимо от других факторов сукцинат способствует неоваскуляризации [275], гемопоезу [122], продукции и высвобождению NO [173]. SUCNR1 в условиях нормоксии гликозилирован на N-конце и связан с ЭПР, но при кислорододефиците отмечается его дегликозилирование и перемещение к плазматической мембране [276]. Возможно, этим объясняется эффект увеличения экспрессии HIF1 $\alpha$  при назначении сукцината, проявляющийся только в условиях гипоксии [11]. Повышение синтеза NO происходит по двум механизмам: быстрый, когда сукцинат увеличивает фосфорилирование eNOS по остатку серина в положении 1177, что вызывает активацию этого фермента [227] и медленный – вследствие ингибирования PHD, следующей за этим активации HIF и экспрессии NOS [167, 256]. Кроме того, сукцинат тормозит деметелирование гистонов ДНК, снижая активность 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ, которые в норме удаляют репрессивные гистоновые метки [95].

Свой вклад в утилизацию сукцината вносит сукцинил-КоА-синтетаза (SCS, от англ. succinyl coenzyme A synthetase) – фермент субстратного фосфорилирования цикла Кребса, который имеет тканезависимую специфичность к адениловым и гуаниловым нуклеотидам и сродство к субстратам – сукцинату и сукцинил-КоА:



Так, в тканях, преимущественно осуществляющих синтез (печень, семенные пузырьки и эпидидимис), SCS использует энергию ГТФ и сукцинат для получения сукцинил-КоА, который, в свою очередь, является предшественником гема и, как следствие, гемсодержащих белков. Напротив, в тканях, характеризующихся повышенной потребностью в энергии, таких как миокард, фермент предпочтительнее использует АДФ и катализирует прямую реакцию, что в

совокупности приводит к быстрому высвобождению АТФ. Особенно высокая экспрессия АТФ-образующей изоформы SCS отмечается в поздних сперматидях [91].

Важным моментом в понимании функций сукцината оказалось открытие специфической посттрансляционной модификации – сукцинилирования. На активность этого процесса влияет доступность субстрата – сукцинил-КоА, который является продуктом прямой реакции 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса и обратной реакции сукцинил-КоА-синтетазы в митохондриях (реакция 15), а также продуктом окисления жирных кислот в пероксисомах [109]. Активность SCS снижается во время окислительного стресса, что приводит к меньшему расходованию сукцинил-КоА и, соответственно, усилению сукцинилирования [260]. Увеличение доли этой модификации также отмечается и при гипоксии [197].

Чаще всего анион янтарной кислоты переносится от сукцинил-КоА на остатки лизина белков [157]. Сукцинилирование СОД приводит к снижению её активности [249], а сукцинилирование остатков лизина в положении 222 в А цепях ЛДГ приводит к нарушению их лизосомальной деградации [190]. Десукцинилирование происходит под действием сиртуинов и в присутствии НАД<sup>+</sup> [109]. В условиях гипоксии, когда нарушается митохондриальное окисление НАДН, эта реакция значительно тормозится, что, возможно, приводит к истощению запасов сукцината. Мы можем предположить, что в этом свете стабилизация ЛДГА, реакция которой направлена на получение НАД<sup>+</sup>, играет роль регулятора количества сукцината.

В тканях грызунов около 70% мишеней сукцинилирования находятся в митохондриях [189]. Среди них наиболее распространёнными являются термогенин, глутаматдегидрогеназа, АТФ-синтазы и СДГ, активность которых при этом снижается [242, 285]. Что говорит о важной роли баланса сукцинилирования/десукцинилирования в развитии вторичной митохондриальной дисфункции.

Помимо реакций сукцинилирования сукцинил-КоА расходуется на синтез гема – структурного компонента гемоглобина, миоглобина и цитохромов. Доступность субстрата для синтеза этих молекул может стать решающей в регуляции доставки и использования кислорода клеткой.

Таким образом, эффекты сукцината распространяются гораздо дальше, чем регуляция энергетического баланса клетки, отвечая за сигналинг, модификацию и регуляцию активности белков.

### **1.3.3.5. Участие лактата в патогенезе и адаптации при гипоксии**

Молочная кислота – ещё один метаболит наряду с сукцинатом, который играет роль медиатора между метаболическими изменениями и регуляторными механизмами. Преимущественно лактат образуется в результате восстановления пирувата ЛДГ в анаэробных условиях и используется как субстрат для глюконеогенеза или источник энергии после гипоксии. Долгое время молочная кислота считалась конечным продуктом метаболизма, не имеющим в клетке какой-либо значимой функции. Однако современные исследования всё больше уделяют внимания этому метаболиту, раскрывая его регуляторные и сигнальные способности и значение как энергетического субстрата, например, в сперматозоидах [25, 105, 178, 219]. Показано, что лактат может образовываться в больших количествах даже в условиях нормоксии [88, 104]. Вероятно, образование молочной кислоты и последующий транспорт её в митохондрии, где происходит высвобождение из неё пировиноградной кислоты, является основным путём доставки пирувата для включения его в дальнейший путь катаболизма [105]. Являясь активатором рецептора, сопряжённого с G-белком (GPR81), лактат усиливает экспрессию МСТ [178]. Кроме того, наблюдается прямая зависимость экспрессии МСТ от метаболической активности сперматозоидов: высокая в головке эпидидимиса при процессах созревания и низкая в хвосте в ходе хранения [87], что указывает на меняющуюся интенсивность энергетических процессов в зрелых гаметях.

Включение лактата, как субстрата, в митохондриальное окисление сопровождается продукцией АФК [286], как предполагают авторы исследования,

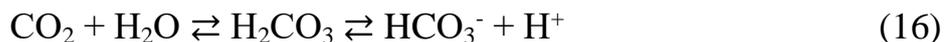
это опосредовано повышением НАДН и реверсией движения электронов в пируватдегидрогеназном комплексе или его ингибированием. Учитывая снижение скорости окисления НАДН в условиях кислорододефицита, можно предположить, что избыточное поступление лактата в митохондрии и превращение его в пируват при гипоксии будет сопровождаться усилением окислительного стресса.

Участие лактата в посттрансляционной модификации белков открыто относительно недавно на примере гистонов [195]. Лактилированию подвергаются остатки лизина полипептидной цепи [234]. Модификация гистонов может иметь решающее значение в условиях изменённого метаболизма, например, при голодании, или гипоксии [182], модулируя активность генов, в чём проявляется роль гистонов в качестве биосенсоров [115, 126]. Снижение активности ЛДГА влечёт за собой уменьшение лактилирования гистонов, и, как следствие, нарушение индукции регулируемых ими генов, среди которых гены VEGF и аргиназы [277]. Ещё одно исследование доказывает сигнальную функцию лактата: молочная кислота вызывает релаксацию в плацентарных сосудах человека опосредованно цГМФ [231]. Таким образом, можно предположить участие лактата в регуляции тонуса сосудов и метаболизме оксида азота (II). Кроме того, существуют доказательства активации HIF1 $\alpha$  лактатом [105, 264].

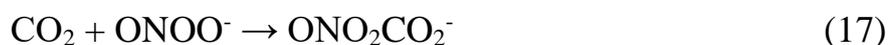
#### **1.3.3.6. Гиперкапния**

Упрощённо клеточное дыхание можно представить как потребление кислорода и выделение углекислого газа. Как говорилось ранее, ряд нарушений приводит к нарушению баланса между газами, вследствие затруднения физиологического дыхания. Многие исследования освещают вопрос взаимного влияния гипоксии и гиперкапнии, так как чаще всего эти явления дополняют друг друга.

Переход грызунов на дыхание газовой смесью, содержащей высокие концентрации CO<sub>2</sub>, приводит к смещению рН в кислую сторону [121]. В водных средах углекислый газ образует равновесную смесь угольной кислоты и продуктов её диссоциации, благодаря чему возможна реализация нескольких механизмов его участия в формировании окислительного стресса при гипоксии:



Установлено, что гиперкапния оказывает протективное действие при ишемии или гипоксии [262]. В частности, углекислый газ может выступать в роли поглотителя АФА [281].  $\text{CO}_2$  обладает способностью связывать молекулы пероксинитрита с образованием нитропероксикарбоната, тем самым снижая его реакционную способность [99] (реакция 17). При разложении  $\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$  образует карбонатный радикал и радикал диоксида азота (реакция 18), более стабильные молекулы, способные диффундировать и более избирательно окислять субстраты, благодаря чему сигнал может распространяться на некоторое расстояние от места их синтеза [121].



Другой механизм снижения окислительного стресса основан на стабилизации комплекса железо-трансферрин, что препятствует участию этого металла в окислительных реакциях [281]. Уменьшению окислительного стресса способствует ингибирование ксантиноксидазы в условиях гиперкапнии [273], что сопряжено со снижением продукции АФК.

Экспериментально подтверждено, что гиперкапния способствует ядерной транслокации  $\text{HIF}1\alpha$  и может стимулировать экспрессию некоторых белков [161]. Однако отрицательное влияние на скорость гликолиза может провоцировать ацидоз, возникающий за счёт диссоциации угольной кислоты [178]. С другой стороны, сам карбонатный анион может выступать в роли окислителя функциональных групп белков [124]. По-видимому, эффекты про- и антиоксиданта, как и в случае с  $\text{NO}$ , проявляются дозозависимо.

Таким образом, гипоксия – это многофакторное состояние, адаптивный ответ на которое также неоднозначен и зависит от множества переменных. Определение роли компонентов сигнальных путей и модуляторов при дефиците кислорода является целью настоящего исследования.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. РАБОТА С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ

Эксперимент выполнен на 120 половозрелых самцах аутбредных крыс сток Wistar, предоставленных питомником лабораторных животных «Пушино» (г. Пушино, Московская область), которые были разделены на 15 групп по 8 особей в каждой [16]. Животные прошли до начала эксперимента 21-дневный карантин в условиях вивария на базе РязГМУ им. И.П. Павлова (г. Рязань, ул. Высоковольтная, д.7). Возраст животных составлял 8 недель, что соответствует возрасту половой зрелости, масса животных в среднем составляла 200-280 г. Уход за животными (расчёт рациона, подача сухого комбинированного корма и питьевой воды, смена подстилки) осуществлялся сотрудниками вивария, манипуляции с животными, соответствующие условиям эксперимента, выполнялись непосредственно диссертантом (исследователем). Животные получали воду и корм *ad libitum*. 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, установленными Приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» (не действует на территории РФ с 25 июня 2020 года на основании постановления Правительства РФ от 13 июня 2020 года N 857); Конвенцией об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях, ETS N 123, Страсбург, 18 марта 1986 г.; Приказом МЗ РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

#### 2.1.1. Дизайн исследования:

*группа 1*: контроль к группе 2;

*группа 2 (НОГ)*: моделирование нормобарической острой гипоксии;

**группа 3 (НО, нормоксия):** контроль к группе 4;

**группа 4 (НХГ):** моделирование нормобарической хронической гипоксии;

**группа 5 (NaCl):** контроль к группам 6, 8, 10;

**группа 6 (L-NAME):** моделирование дефицита оксида азота (II);

**группа 7 (L-NAME+НХГ):** моделирование дефицита оксида азота (II) в условиях хронической нормобарической гипоксии; сравнением для этой серии эксперимента служили группы 4 и 6;

**группа 8 (L-Arg):** введение экзогенного L-аргинина;

**группа 9 (L-Arg+НХГ):** введение экзогенного L-аргинина в условиях хронической нормобарической гипоксии; сравнением для этой серии эксперимента служили группы 4 и 8;

**группа 10 (Сук):** введение экзогенного сукцината;

**группа 11 (Сук+НХГ):** введение экзогенного сукцината в условиях хронической нормобарической гипоксии; сравнением для этой серии эксперимента служили группы 4 и 10;

**группа 12 (Сук+L-NAME):** моделирование дефицита оксида азота (II) при назначении животным экзогенного сукцината; сравнением для этой серии эксперимента служили группы 6 и 10;

**группа 13 (Сук+L-NAME+НХГ):** моделирование дефицита оксида азота (II) при назначении животным экзогенного сукцината в условиях хронической нормобарической гипоксии; сравнением для этой серии эксперимента служили группы 4, 6 и 10.

**группа 14 (Сук+L-Arg):** введение экзогенного L-аргинина при назначении животным экзогенного сукцината; сравнением для этой серии эксперимента служили группы 8 и 10;

**группа 15 (Сук+L-Arg+НХГ):** введение экзогенного L-аргинина при назначении животным экзогенного сукцината в условиях хронической нормобарической гипоксии; сравнением для этой серии эксперимента служили группы 4, 8 и 10.

## **2.1.2. Экспериментальная модель гипоксии и схема введения препаратов**

### **2.1.2.1. Моделирование нормобарической острой гипоксии (НОГ)**

Моделирования нормобарической острой гипоксии проводили по методике нормобарической острой гипоксии с гиперкапнией М.В. Кораблевой и П.И. Лукиенко (1976) в модификации Н.Д. Авсеенко [71]. Для этого использовали герметичную камеру объёмом 1,2 л (длина×ширина×высота: 10,5×10,5×11 см), которая была подключена к многоканальному газоанализатору МАГ-6-П-К (O<sub>2</sub>, интервал измерения 0-100%, CO<sub>2</sub>, интервал измерения 0-12%, АО «ЭКСИС», РФ). Животные помещались в камеру по 1 особи. Длительность нахождения животного в гермокамере составляла 30 минут. Манипуляции проводили в утренние часы однократно. Контролем служила группа животных, которые помещались на время эксперимента в вентилируемую камеру.

### **2.1.2.2. Моделирование нормобарической хронической гипоксии (НХГ)**

Для создания дефицита кислорода в условиях атмосферного давления без подъёма на высоту использовали герметичную камеру объёмом 1,2 л (длина×ширина×высота: 10,5×10,5×11 см), которая была подключена к многоканальному газоанализатору МАГ-6-П-К (O<sub>2</sub>, интервал измерения 0-100%, CO<sub>2</sub>, интервал измерения 0-12%, АО «ЭКСИС», РФ). Данные о содержании газов во вдыхаемом воздухе служили критерием физиологического ответа на моделируемые условия. За критические точки для сравнения приняты содержание кислорода – 12% [160] и углекислого газа – 3% [262] (t(O<sub>2</sub>) и t(CO<sub>2</sub>) соответственно, выражали в минутах). Животные помещались в камеру по 1 особи. Длительность нахождения животного в гермокамере определялась индивидуально для каждого животного по показателю газоанализатора, сеанс длился до тех пор, пока уровень кислорода в камере не снижался до 10%. Таким образом обеспечивалось единообразие условий по формированию гипоксии средней тяжести [40] и подтверждалось, что все животные достигали критическую отметку 12% O<sub>2</sub>. Манипуляции проводили в утренние часы ежедневно один раз в день на протяжении 14 дней [50, 62]. Контролем служила группа животных, которые помещались на время эксперимента в вентилируемую

камеру. Нормобарическая хроническая гипоксия моделировалась отдельно и в сочетании с препаратами: раствор янтарной кислоты, метилового эфира N( $\omega$ )-нитро-L-аргинина, L-аргинина.

### **2.1.2.3. Введение экзогенного сукцината**

Животным вводили раствор сукцината в виде 4% раствора янтарной кислоты (Диаэм, РФ) в 0,9% NaCl внутрибрюшинно одноразовым инсулиновым шприцем из расчёта 100 мг сукцината на кг массы тела животного [70, 81]. Инъекции делали один раз в день в утренние часы ежедневно в течение 14 дней. Контролем служила группа животных, получавших эквивалентные инъекции физиологического раствора. Введение сукцината крысам осуществляли отдельно, в сочетании с гипоксией и в сочетании с препаратами: раствор метилового эфира L-нитроаргинина (L-NAME), L-аргинина.

### **2.1.2.4. Моделирование дефицита оксида азота (II)**

Для моделирования дефицита оксида азота (II) животным вводили неселективный ингибитор синтазы оксида азота (II) метиловый эфир L-нитроаргинина (N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME, Sigma-Aldrich, США) в виде 1% раствора в 0,9% NaCl внутрибрюшинно одноразовым инсулиновым шприцем из расчёта 25 мг L-NAME на кг массы тела животного [287]. Инъекции делали один раз в день в утренние часы ежедневно в течение 7 дней. Введение L-NAME крысам осуществляли отдельно (7 дней), в сочетании с гипоксией (7 дней: с 8 по 14 день моделирования гипоксии за 30 минут до сеанса) и в сочетании с введением раствора сукцината (7 дней: с 8 по 14 день через 30 минут после введения янтарной кислоты).

### **2.1.2.5. Введение экзогенного L-аргинина**

Животным вводили естественный субстрат синтазы оксида азота (II) L-аргинин (Диаэм, РФ) в виде 20% раствора в 0,9% NaCl внутрибрюшинно одноразовым инсулиновым шприцем из расчёта 500 мг аргинина на кг массы тела животного [3]. Инъекции делали один раз в день в утренние часы ежедневно в течение 10 дней. Введение L-аргинина крысам осуществляли отдельно (10 дней), в сочетании с гипоксией (10 дней: с 5 по 14 день моделирования гипоксии за 30

минут до сеанса) и в сочетании с введением раствора сукцината (10 дней: с 5 по 14 день через 30 минут после введения янтарной кислоты).

## **2.2. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.2.1. Получение биологического материала**

В день вывода животных из эксперимента сразу после окончания процедур крысам вводили наркоз: смесь «Золетил 100» (Virbac С.А., Франция) и «Ксиланит» ("NITA-FARM", РФ) в дозировке 6 мг/кг массы тела животного одноразовым инсулиновым шприцем внутримышечно. Через 10-15 минут после введения наркоза, когда брюшная стенка полностью утрачивала мышечный тонус, ножницами делали продольный разрез.

Из брюшной аорты одноразовым шприцем с иглой 0,8\*40 отбирали кровь, которую переносили в конические пробирки и смешивали с 16% раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, Диаэм, РФ), в соотношении 9 : 1, затем центрифугировали 10 минут при 3000 g на центрифуге медицинской СМ-6М (SIA ELMI, Латвия) для осаждения форменных элементов. Полученную плазму использовали для определения активности лактатдегидрогеназы, концентрации молочной кислоты, тестостерона и эстрадиола.

Далее отбирали семенные пузырьки, головки и хвосты от обоих придатков яичка. Из обоих семенных пузырьков в градуированную пробирку выделяли секрет, объём которого доводили до 2 мл 0,9% раствором NaCl. Секрет семенных пузырьков использовали для определения концентрации фруктозы.

Ткани промывали в Трис-НСl буфере рН=7.4, содержащем 0,25 М раствор сахарозы (ООО «Химмед СПб», РФ) и 1 мМ ЭДТА (Диаэм, РФ), затем измельчали ножницами и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Potter S (Sartorius AG, Германия) в Трис-НСl буфере, в соотношении 1 часть ткани к 9 частям буфера. Все процедуры проводили при температуре не выше 4°C. Полученные гомогенаты центрифугировали дважды: первое центрифугирование в

конических пробирках на центрифуге медицинской СМ-6М (SIA ELMI, Латвия) 15 минут при 3000 g для осаждения ядер и неразрушенных клеток; второе центрифугирование в пробирках типа Eppendorf на высокоскоростной центрифуге Sigma 3-18KS с охлаждением (SIGMA, Германия) 15 минут при 14000 g для осаждения митохондрий. Осадок ресуспендировали в среде выделения и делили на 2 части: первую часть оставляли без изменений, а ко второй части для разрушения митохондриальной мембраны добавляли раствор детергента Тритон X-100 (ООО «Компания Хеликон», РФ) в конечной концентрации в растворе 0,02%. Суспензию митохондрий (митохондриальная фракция, МФ) и безмитохондриальную фракцию цитоплазмы (цитоплазма, цитоплазматическая фракция, ЦФ) использовали в качестве биоматериала для исследований: первая часть (без детергента) для определения активности мембранно-связанных ферментов – СДГ, ЦО,  $H^+$ /АТФ-синтазы; вторую часть (в присутствии детергента) для определения метаболитов NO, лактата, сукцината, HIF1 $\alpha$ , активности ЛДГ, СОД,  $\alpha$ -глюкозидазы и окислительной модификации белков.

## **2.2.2. Методы исследования биологического материала**

### **2.2.2.1. Определение концентрации общего белка**

Определение концентрации общего белка (мг/мл) проводили в каждой пробе в суспензии митохондрий и цитоплазме по методу Лоури [232] с помощью набора «Клини Тест-БЛ» (ЭКО Сервис, РФ). Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина-Чокальтеу в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации белка в исследуемой пробе и определяется фотометрически при длине волны 750 нм с помощью фотоколориметра КФК-3-01-"ЗОМЗ" (ОАО «Загорский оптико-механический завод», РФ). Все необходимые реактивы, включая калибровочный раствор альбумина, входили в состав набора. Ход определения и построение калибровочного графика производились согласно инструкции, прилагаемой к набору, без изменений. Содержание белков рассчитывали по калибровочному графику.

Полученные значения содержания общего белка использовали далее для расчёта показателей ( $X$ ) в тканях по схеме:  $X=A/C$ , где  $A$  – содержание метаболитов или активность ферментов в тканях, рассчитанные согласно методике исследования;  $C$  – концентрация белка в пробе, мг/мл.

#### **2.2.2.2. Определение концентрации молочной кислоты**

Определение концентрации молочной кислоты проводили в суспензии митохондрий и цитоплазме всех исследуемых тканей (мкмоль/мг белка), а также в плазме крови (ммоль/л) энзиматическим колориметрическим методом реакцией Триндера [112] с помощью набора «Молочная кислота-Ольвекс» (Ольвекс Диагностикум, РФ). Метод основан на способности лактооксидазы катализировать окисление молочной кислоты до пировиноградной с образованием перекиси водорода. Образующаяся перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и 4-хлорфенола с образованием хинониминового красителя красно-розового цвета. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации молочной кислоты в исследуемой пробе и определяется фотометрически при длине волны 505 нм с помощью биохимического анализатора StatFax 1904+ (Awareness Technology Inc., США). Все необходимые реактивы, включая калибровочный раствор молочной кислоты, входили в состав набора. Ход определения производился согласно инструкции, прилагаемой к набору, без изменений.

#### **2.2.2.3. Определение концентрации сукцината**

Определение концентрации сукцината (мкмоль/мг белка) проводили в суспензии митохондрий всех исследуемых тканей энзиматическим колориметрическим методом [257] с помощью набора «Succinate Colorimetric Assay Kit» (Sigma-Aldrich Co, США). Метод основан на протекании сопряжённой ферментативной реакции, в результате которой образуется окрашенное вещество. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации сукцината в исследуемой пробе и определяется фотометрически при длине волны 450 нм с помощью иммуноферментного анализатора StatFax 3200 (Awareness

Technology Inc., США). Все необходимые реактивы, включая калибровочный раствор сукцината, входили в состав набора. Ход определения и построение калибровочного графика производились согласно инструкции, прилагаемой к набору, без изменений.

#### **2.2.2.4. Определение количества $\alpha$ -субъединицы гипоксией индуцируемого фактора (HIF1 $\alpha$ )**

Определение количества HIF1 $\alpha$  (нг/мг белка) проводили в суспензии митохондрий и цитоплазме всех исследуемых тканей с помощью набора для гетерогенного иммуноферментного анализа для определения гипоксией индуцируемого фактора у крыс ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 $\alpha$ ) (Cloud-Clone Corp., США). Метод основан на способности «сэндвич»-конъюгата [антиHIF1 $\alpha$ ]+[HIF1 $\alpha$ ]+[антиHIF1 $\alpha$ -стрептавидин-пероксидаза] катализировать реакцию окисления тетраметилбензидина с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации HIF1 $\alpha$  в исследуемой пробе и определяется фотометрически при длине волны 450 нм с помощью иммуноферментного анализатора StatFax 3200 (Awareness Technology Inc., США). Все необходимые реактивы, включая калибровочный раствор HIF1 $\alpha$ , входили в состав набора. Ход определения и построение калибровочного графика производились согласно инструкции, прилагаемой к набору, без изменений. Далее рассчитывали коэффициент содержания HIF1 $\alpha$  в митохондриальной фракции по отношению к цитоплазматической фракции (МФ/ЦФ).

#### **2.2.2.5. Определение концентрации метаболитов оксида азота (II)**

Определение концентрации метаболитов оксида азота (II) (NO<sub>x</sub>) (нмоль/мг белка) проводили в суспензии митохондрий всех исследуемых тканей по реакции с реактивом Грисса [53]. Метод основан на регистрации интенсивности окраски, образующейся в реакции азосочетания нафтилэтилендиамина с диазотированным сульфаниламидом, который образуется в присутствии нитритов. Интенсивность окраски зависит от количества нитритов и нитратов, которые восстанавливаются в нитриты с помощью VCl<sub>3</sub> и пропорциональна концентрации метаболитов оксида

азота (II) в исследуемой пробе, определяется фотометрически при длине волны 545 нм с помощью иммуноферментного анализатора StatFax 3200 (Awareness Technology Inc., США).

#### **2.2.2.6. Определение концентрации фруктозы**

Определение концентрации фруктозы (мг/мг белка) проводили в секрете семенных пузырьков по реакции Селиванова [247]. Метод основан на способности фруктозы образовывать при нагревании с соляной кислотой оксиметилфурфурол, который вступает в реакцию конденсации с резорцином, продукт реакции (ксантеновый краситель) окрашивает реакционную среду в вишнёво-красный цвет. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации фруктозы в исследуемой пробе и определяется фотометрически при длине волны 490 нм с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», РФ).

#### **2.2.2.7. Определение содержания тестостерона и эстрадиола**

Определение содержания гормонов проводили в плазме крови методом конкурентного твёрдофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов «СтероидИФА-тестостерон» и «СтероидИФА-эстрадиол» (Алкор Био, РФ). Метод основан на способности «сэндвич»-конъюгата [анти-гормон]+[гормон-пероксидаза] катализировать реакцию окисления тетраметилбензидина в тетраметилбензидиндиимин (синий цвет, после остановки реакции кислотой окраска реакционной среды переходит в жёлтый). Гормон в исследуемом образце конкурирует с гормоном, меченым пероксидазой, за сайты связывания с иммобилизованными антителами. Чем выше концентрация гормона в исследуемом растворе, тем ниже скорость связывания меченого конъюгата и тем меньше интенсивность окраски реакционной среды. Интенсивность окраски реакционной среды определяется фотометрически при длине волны 450 нм с помощью иммуноферментного анализатора StatFax 3200 (Awareness Technology Inc., США). Все необходимые реактивы входили в состав набора. Ход определения и расчёт содержания тестостерона (в нмоль/л) и эстрадиола (пг/мл) производился согласно инструкции, прилагаемой к набору, без изменений.

### **2.2.2.8. Определение содержания продуктов окислительной модификации белков (ОМБ)**

Определение содержания продуктов окислительной модификации белков проводили в суспензии митохондрий всех исследуемых тканей по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой [79]. Метод основан на спектрофотометрической регистрации карбонильных производных аминокислотных остатков белков по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с последующим подсчётом площадей под кривой спектра, полученных при определении 2,4-динитрофенилгидразонов альдегидных производных аминокислот нейтрального характера (АДНФГнейт) и основного характера (АДНФГосн), а также кетоновых производных нейтрального и основного характера (КДНФГнейт и КДНФГосн соответственно), соотношения АДНФГ/КДНФГ, общей площади под кривой спектра и вычислением резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков (РАП), как разницы между принятой за 100% металл-зависимой окислительной модификации белков и спонтанной окислительной модификации белков. Определение проводили с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», РФ) при следующих длинах волн: 230 нм, 254 нм, 270 нм, 280 нм, 356 нм, 363 нм, 370 нм, 428 нм, 430 нм, 434 нм, 520 нм, 535 нм.

Расчёт площадей под кривой спектра, соотношения АДНФГ к КДНФГ, расчёт РАП производили с использованием программы для ЭВМ «Программа определения уровня карбонильных производных белков и резервно-адаптационного потенциала в норме и при патологии» [67], площади под кривыми выражали в у.е./мг белка, РАП в %.

### **2.2.2.9. Определение активности $\alpha$ -глюкозидазы**

Определение активности  $\alpha$ -глюкозидазы (у.е./мг белка) проводили в цитоплазме головки и хвоста придатка яичка оптимизированным кинетическим методом [172] с помощью набора « $\alpha$ -Glucosidase Activity Assay Kit» (Sigma-Aldrich Co, США). Метод основан на способности  $\alpha$ -глюкозидазы катализировать реакцию гидролиза п-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкопиранозида с образованием

свободного п-нитрофенола. Скорость реакции пропорциональна активности фермента в исследуемой пробе и рассчитывается по изменению оптической плотности реакционной среды, определяемой фотометрически при длине волны 405 нм с помощью иммуноферментного анализатора StatFax 3200 (Awareness Technology Inc., США). Все необходимые реактивы входили в состав набора. Ход определения производился согласно инструкции, прилагаемой к набору, без изменений.

#### **2.2.2.10. Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ)**

Определение активности СДГ (нмоль сукцината/мг белка) проводили в суспензии митохондрий всех исследуемых тканей по скорости восстановления феррицианида калия [54]. Метод основан на восстановлении феррицианида калия ( $K_3[Fe(CN)_6]$ , жёлтый) в ферроцианид калия ( $K_4[Fe(CN)_6]$ , бесцветный) янтарной кислотой под действием СДГ. Количество восстановленного феррицианида пропорционально активности фермента в исследуемой пробе и рассчитывается по изменению оптической плотности реакционной среды, определяемой фотометрически при длине волны 420 нм с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», РФ).

#### **2.2.2.11. Определение активности цитохромоксидазы (ЦО)**

Определение активности ЦО (у.е./мг белка) проводили в суспензии митохондрий всех исследуемых тканей по скорости окисления цитохрома с [78]. Метод основан на непрерывной регистрации убыли восстановленного цитохрома с в реакции окисления кислородом в присутствии ЦО. Скорость реакции пропорциональна активности фермента в исследуемой пробе и рассчитывается по изменению оптической плотности реакционной среды, определяемой фотометрически при длине волны 545 нм с помощью биохимического анализатора StatFax 1904+ (Awareness Technology Inc., США).

#### **2.2.2.12. Определение активности $H^+$ /АТФ-синтазы**

Определение активности  $H^+$ /АТФ-синтазы (мкмоль фосфата/(мг белка\*час)) проводили в суспензии митохондрий всех исследуемых тканей по скорости гидролиза АТФ [5]. Метод основан на регистрации скорости гидролиза АТФ до

АДФ и неорганического фосфата в присутствии  $H^+$ /АТФ-синтазы и ионов магния по молибденовой пробе на фосфорную кислоту. Скорость реакции пропорциональна активности фермента в исследуемой пробе и рассчитывается по изменению оптической плотности реакционной среды, определяемой фотометрически при длине волны 660 нм с помощью фотоколориметра КФК-3-01-"ЗОМЗ" (ОАО «Загорский оптико-механический завод», РФ).

#### **2.2.2.13. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД)**

Определение активности СОД (у.е./мг белка) проводили в суспензии митохондрий всех исследуемых тканей по скорости ингибирования реакции аутоокисления кверцетина [34]. Метод основан на регистрации торможения скорости реакции окисления кверцетина супероксидным анион-радикалом, который образуется в аэробных условиях в присутствии TEMED и дисмутирует в присутствии СОД. Степень снижения скорости реакции пропорциональна активности фермента в исследуемой пробе и рассчитывается по изменению оптической плотности реакционной среды, определяемой фотометрически при длине волны 406 нм с помощью фотоколориметра КФК-3-01-"ЗОМЗ" (ОАО «Загорский оптико-механический завод», РФ).

#### **2.2.2.14. Определение общей активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ)**

Определение общей активности ЛДГ (у.е./мг белка) проводили в суспензии митохондрий и цитоплазме всех исследуемых тканей, а также в плазме крови оптимизированным кинетическим методом [282] с помощью набора «ЛДГ-Ольвекс» (Ольвекс Диагностикум, РФ). Метод основан на регистрации убыли НАДН в реакции окисления пировиноградной кислоты, катализируемой ЛДГ. Скорость реакции пропорциональна активности фермента в исследуемой пробе и рассчитывается по изменению оптической плотности реакционной среды, определяемой фотометрически при длине волны 340 нм с помощью биохимического анализатора StatFax 1904+ (Awareness Technology Inc., США). Все необходимые реактивы входили в состав набора. Ход определения производился согласно инструкции, прилагаемой к набору, без изменений.

### 2.2.2.15. Определение изоформ лактатдегидрогеназы

Определение изоформ ЛДГ проводили в суспензии митохондрий и цитоплазме всех исследуемых тканей методом электрофореза с последующей детекцией. Метод основан на различии изоформ ЛДГ в электрофоретической подвижности во время неокрашенного нативного вертикального диск-электрофореза в 7% полиакриламидном геле (CN-PAGE) [72] с последующей детекцией бендов *in situ* по ферментативной активности ЛДГ в сопряжённой реакции окисления лактата и восстановления нитросинего тетразолия, дающего синее окрашивание в местах локализации фермента на зимограмме [68]. Пример полученной зимограммы (Рисунок 4).

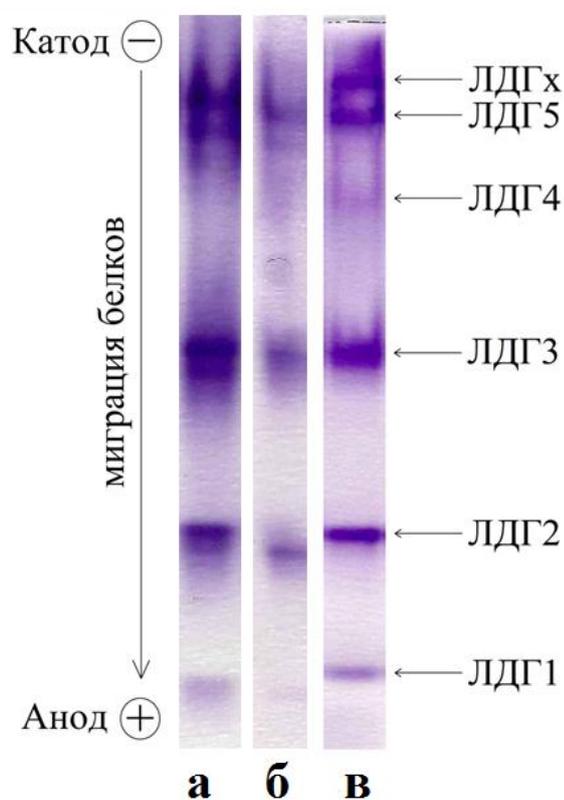


Рисунок 4 – Пример зимограммы лактатдегидрогеназы для семенных пузырьков (а), головки эпидидимиса (б) и хвоста эпидидимиса (в)

Анализ полученного изображения зимограммы проводили с помощью программного обеспечения для персонального компьютера OmniDoc Gel Documentation Analyze (Cleaver Scientific Ltd., Великобритания). Интенсивность окрашивания и ширина бендов пропорциональна активности изофермента, что графически выражается высотой пиков на денситограмме (Рисунок 5).

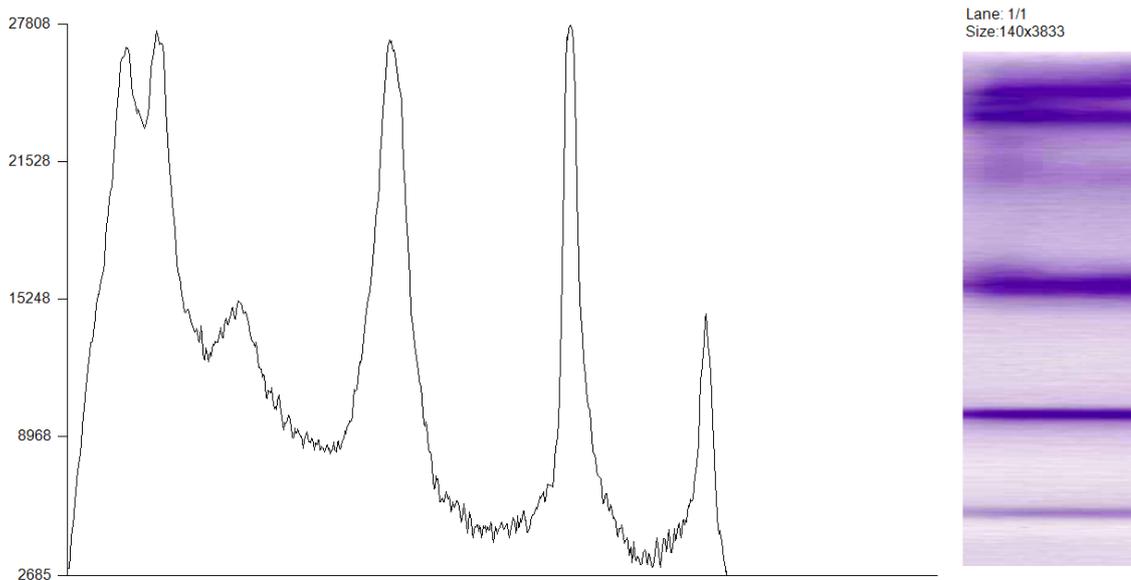


Рисунок 5 – Пример построения денситограммы

Далее производили подсчёт площади пиков, соответствующей оптической плотности бендов и пропорциональной активности изоферментов (Рисунок 6). Долю активности каждой фракции ЛДГ рассчитывали как процент от суммарной активности всех изоформ.

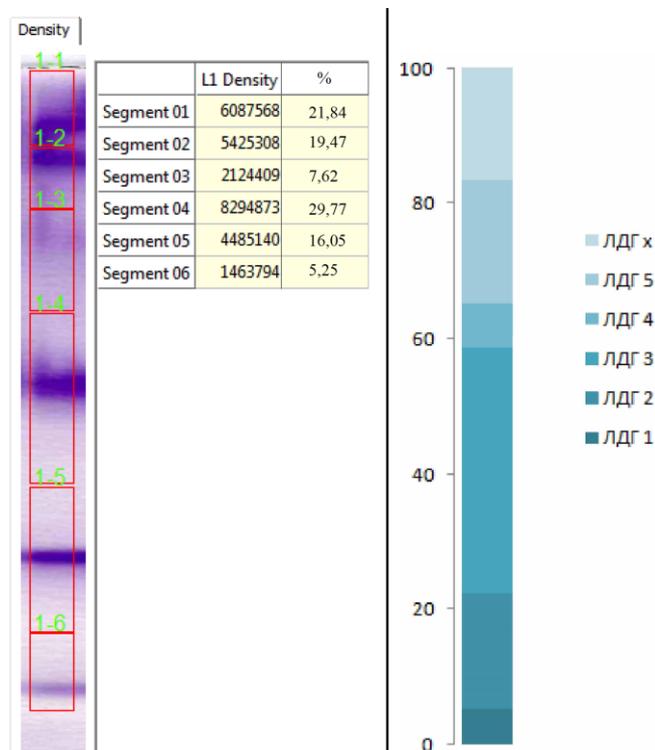


Рисунок 6 – Результаты денситометрии зимограммы ЛДГ

Примечания – слева – значения оптической плотности, рассчитанные программой для каждого бенда; справа – шкала в % и графическая интерпретация, построенная на основании расчёта оптической плотности каждой отдельной фракции с помощью программы «Microsoft Office Excel 2013»

### 2.3. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ «Microsoft Excel 2013» и StatSoft STATISTICA 12. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка [16]. В связи с тем, что распределение не соответствовало нормальному хотя бы в одной из групп сравнения, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни для независимых групп и непараметрический T-критерий Уилкоксона для зависимых. Для выявления взаимосвязи между показателями применяли критерий ранговой корреляции Спирмена. При парном сравнении уровень различий считали статистически значимым при вероятности ошибки  $p < 0,05$ ; при значении  $0,05 \leq p < 0,10$  считали вероятной тенденцию к изменению показателей. При множественном сравнении применяли поправку Бонферрони и считали статистически значимым уровень различий при вероятности ошибки  $p < 0,0167$  для анализа 3 групп и  $p < 0,0083$  для анализа 4 групп [65]. Данные представлены в виде Медиана [Квартиль 1; Квартиль 3] – Ме [Q1; Q3]. Рисунки выполнены с помощью программы GraphPad Prism 9.5.1.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ

На протяжении всего эксперимента по моделированию нормобарической гипоксии, как острой, так и хронической, фиксировали снижение уровня кислорода и увеличение уровня углекислого газа в гермокамере по показаниям многоканального газоанализатора. На основании полученных данных рассчитывали время достижения критических значений уровней газов во вдыхаемом воздухе –  $t(O_2)$  и  $t(CO_2)$ .

Статистически значимых различий между  $t(O_2)$  и  $t(CO_2)$  при моделировании острой гипоксии и первым днём моделирования хронической гипоксии не выявлено (Таблица 1), что подтверждает единообразие методик.

Таблица 1 – Время достижения критических значений содержания газов во вдыхаемом воздухе при моделировании нормобарической острой и хронической гипоксии

Время	Группа 2: НОГ	Группа 4: НХГ, день 1
$t(O_2)$ , мин	12,71 [12; 13,5]	13,18 [12,55; 13,55] p=0,8748
$t(CO_2)$ , мин	4,57 [4,28; 4,77]	4,62 [4,35; 5,25] p=0,7132

Примечания –  $t(O_2)$  – время достижения критического значения уровня кислорода во вдыхаемом воздухе,  $t(CO_2)$  – время достижения критического значения уровня углекислого газа во вдыхаемом воздухе, НОГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической острой гипоксии; НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии

Отличие модели НОГ от НХГ заключалось в продолжительности нахождения животных в описываемых условиях и количестве манипуляций. Животные, подвергшиеся НОГ, помещались в гермокамеру однократно на 30 минут, минимальное значение содержания кислорода при этом достигало 3,3%. При моделировании НХГ грызуны помещались в гермокамеру ежедневно в течение 14 дней однократно в течение дня. Продолжительность пребывания животного в камере ограничивалась только содержанием кислорода во

вдыхаемом воздухе и являлась индивидуальной характеристикой. В среднем для достижения 10%-го уровня  $O_2$  требовалось 16 ( $\pm 2$ ) минут.

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 7).

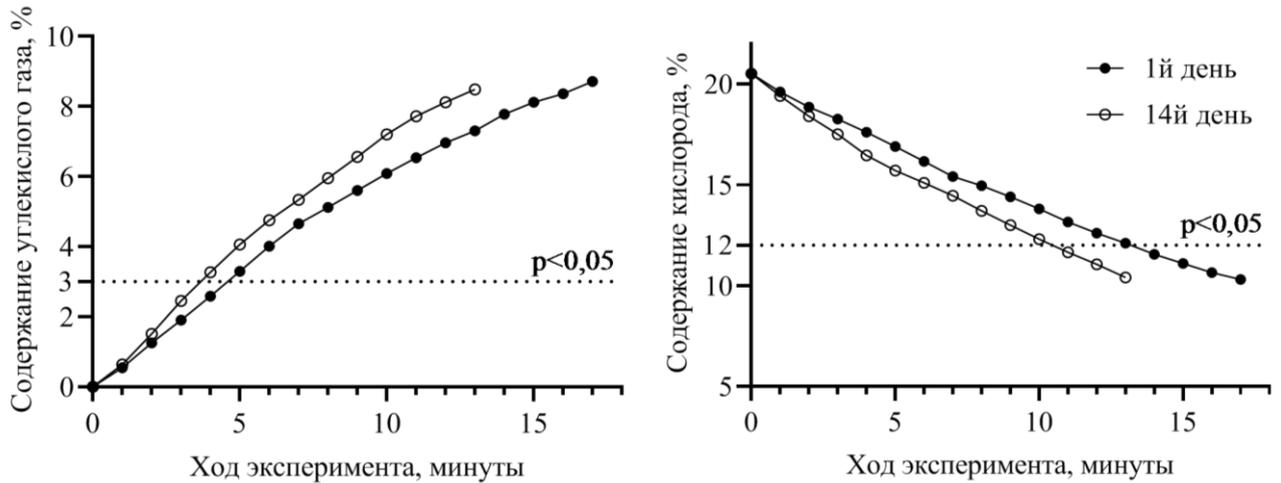


Рисунок 7 – Изменение содержания углекислого газа и кислорода в ходе эксперимента по моделированию нормобарической хронической гипоксии

Примечания – здесь и далее по тексту пунктиром отмечены критические значения содержания газов во вдыхаемом воздухе – 12% для  $O_2$  и 3% для  $CO_2$

Наблюдаемый эффект ускорения расходования кислорода к 14 дню эксперимента, возможно, связан с увеличением кислородной ёмкости крови и более эффективным потреблением его некоторыми тканями [145], развившимися вследствие постоянных гипоксических тренировок.

Анализ активности ЦО в митохондриях семенных пузырьков и эпидидимиса показал, что моделирование НОГ не повлияло на изменение этого параметра (Таблица 2). При НХГ наблюдалось достоверное снижение активности фермента в митохондриальной фракции всех исследуемых тканей.

По-видимому, однократное воздействие кислорододефицита и малая продолжительность эксперимента не позволили отследить метаболический ответ на гипоксический стресс. Поэтому в связи с отсутствием достоверных изменений при моделировании НОГ и выявленными закономерностями в эксперименте с

НХГ нами было принято решение в дальнейшем использовать способ моделирования нормобарической хронической гипоксии [50, 62].

Таблица 2 – Активность цитохромоксидазы при развитии острой и хронической нормобарической гипоксии, в у.е./мг белка

Ткань	Группа 1: контроль к группе 2	Группа 2: НОГ	Группа 3: НО, контроль к группе 4	Группа 4: НХГ
Семенные пузырьки	0,87 [0,31; 1,30]	1,54 [0,99; 1,80] $p_{1,2}=0,16$	1,34 [1,14; 1,72]	0,31 [0,25; 0,42] $p_{3,4}=0,00059^*\downarrow$
Головка эпидидимиса	0,97 [0,54; 2,34]	1,26 [0,86; 1,60] $p_{1,2}=0,64$	0,89 [0,64; 1,04]	0,34 [0,26; 0,49] $p_{3,4}=0,011^*\downarrow$
Хвост эпидидимиса	0,96 [0,76; 1,45]	1,36 [0,99; 1,48] $p_{1,2}=0,37$	1,23 [0,91; 2,21]	0,54 [0,36; 0,64] $p_{3,4}=0,032^*\downarrow$

Примечания – НОГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической острой гипоксии; НО – нормоксия, контроль к группе 4; НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии

В нескольких экспериментальных сериях НХГ сопровождалась моделированием экспериментального L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II), или назначением L-аргинина, как субстрата для синтеза NO, или назначением сукцината в качестве антигипоксанта фактора.

Прослеживалось сходство в результатах экспериментов по моделированию НХГ и НХГ с назначением экзогенного L-аргинина, однако для животных, подвергшихся гипоксии и получавших L-аргинин, статистически значимое снижение времени зафиксировано только для  $t(O_2)$  (Рисунок 8).

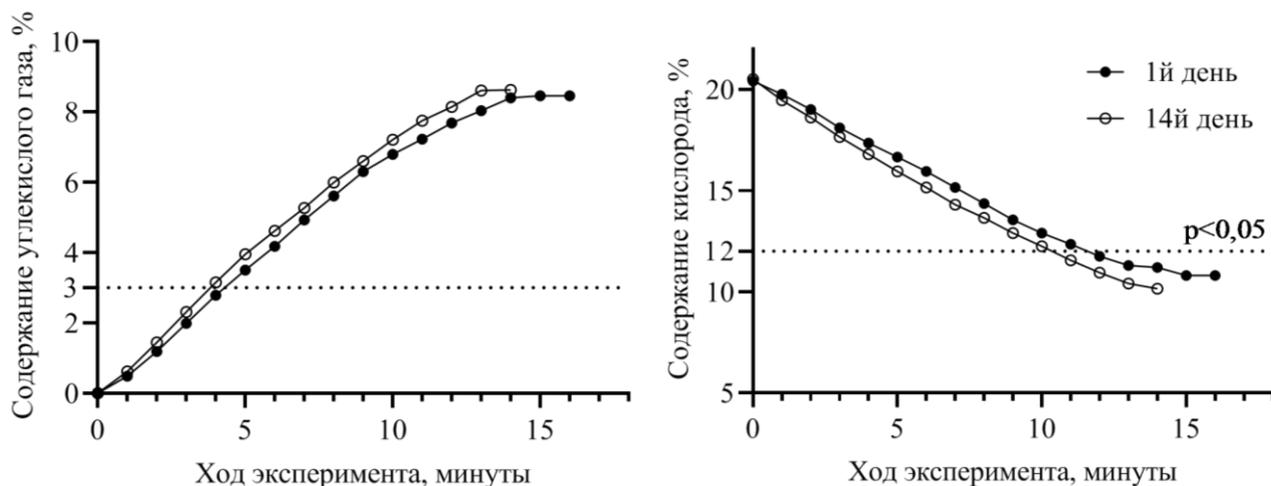


Рисунок 8 – Изменение содержания углекислого газа и кислорода в ходе эксперимента по моделированию НХГ при назначении L-аргинина

При сравнении  $t(O_2)$  и  $t(CO_2)$  в первый и последний день эксперимента по моделированию НХГ у животных, получавших сукцинат, отмечалось достоверное увеличение времени достижения критических значений для углекислого газа (Рисунок 9).

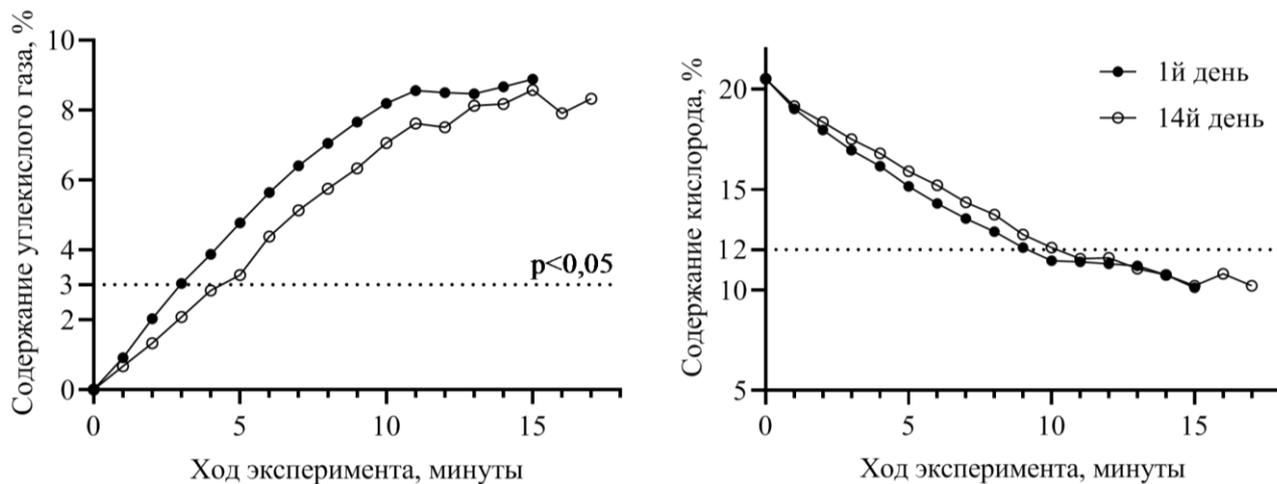


Рисунок 9 – Изменение содержания углекислого газа и кислорода в ходе эксперимента по моделированию НХГ при назначении сукцината

При сравнении  $t(O_2)$  и  $t(CO_2)$  в первый и последний день эксперимента по моделированию НХГ у животных, получавших L-NAME, достоверных отличий во времени достижения критических значений для газов выявлено не было.

В большинстве случаев отмечалась тенденция сокращения времени эксперимента с каждым повтором. Однако в серии НХГ+Сук наблюдалось увеличение общего времени нахождения грызунов в гермокамере к последнему дню эксперимента по сравнению с первым.

В плазме крови определяли общую активность ЛДГ и концентрацию молочной кислоты. Достоверных изменений активности фермента в изучаемых условиях установлено не было.

При моделировании НХГ содержание лактата в плазме крови достоверно снижалось относительно группы животных, пребывавших во время эксперимента в условиях нормоксии (Рисунок 10).

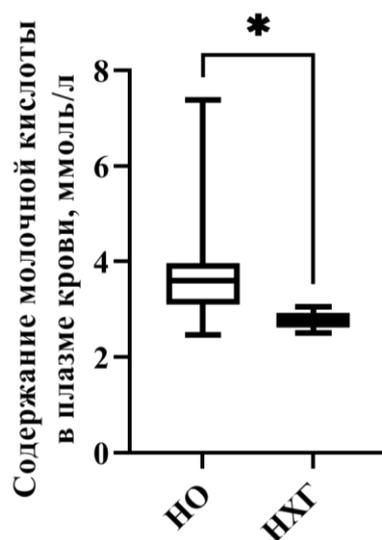


Рисунок 10 – Содержание молочной кислоты в плазме крови в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии

Примечания – здесь и далее по тексту \* – показаны только статистически значимые отличия между сравниваемыми группами

Ингибирование синтеза оксида азота (II) не привело к изменению показателя относительно контроля. Но, по сравнению с этой экспериментальной группой, моделирование гипоксии в сочетании с ингибированием NOS вызвало снижение лактата в плазме крови (Рисунок 11).

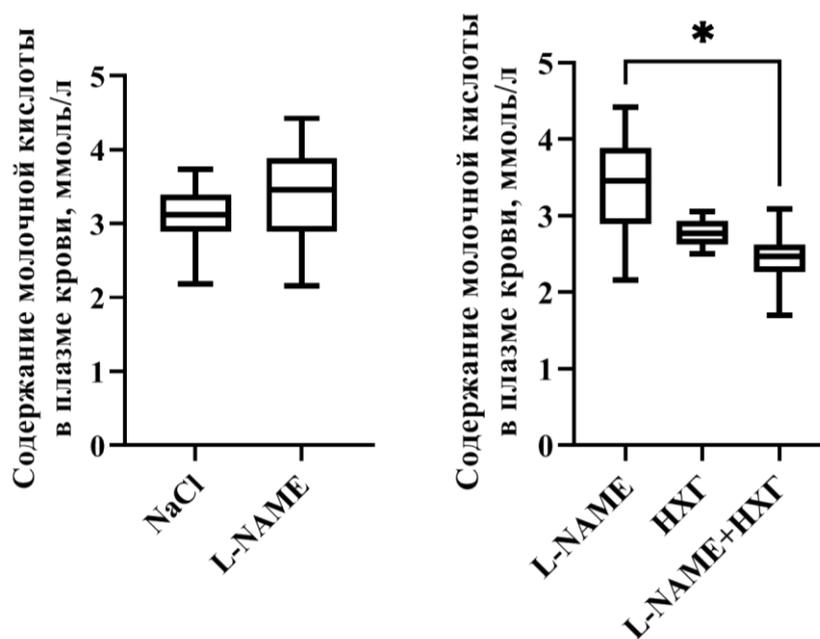


Рисунок 11 – Содержание молочной кислоты в плазме крови в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии на фоне получения животными L-NAME

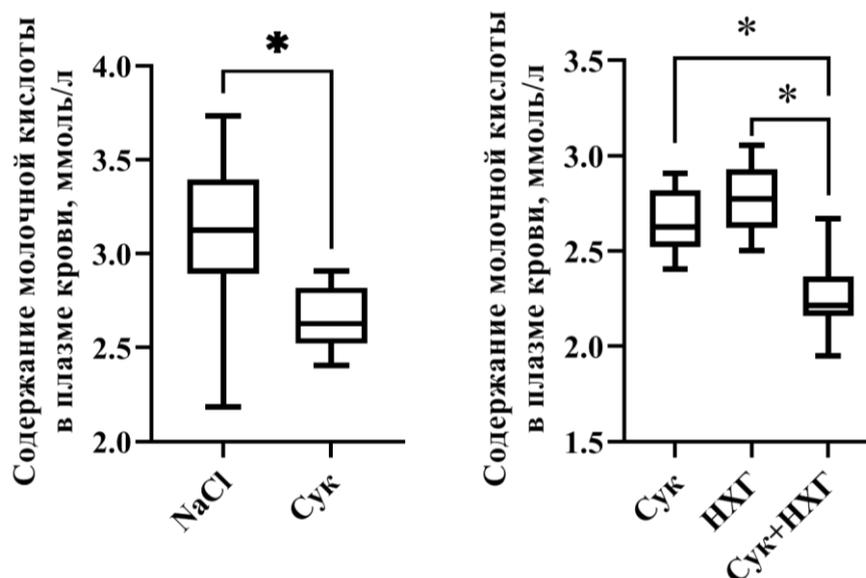


Рисунок 12 – Содержание молочной кислоты в плазме крови в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии и её коррекции сукцинатом

Между значениями концентрации лактата при назначении животным L-аргинина (изолированно и в сочетании с НХГ) и при моделировании НХГ достоверных отличий показателя зафиксировано не было.

Результаты исследования влияния сукцината при моделировании дефицита оксида азота (II) не показали отличий от группы животных, получавших только L-NAME, но оказались статистически значимо выше, чем в группе животных, получавших только сукцинат (Рисунок 13). Совместное влияние сразу трёх условий эксперимента привело к повышению уровня лактата по сравнению с группами НХГ и Сук.

Получение животными экзогенного L-аргинина не повлияло на изменение показателя, независимо от наличия сопутствующих условий эксперимента – гипоксии и сукцината. Однако применение L-аргинина и сукцината на фоне гипоксии показало статистически значимое снижение молочной кислоты относительно групп животных, подвергшихся только НХГ, получавших только сукцинат или только L-аргинин (Рисунок 14).

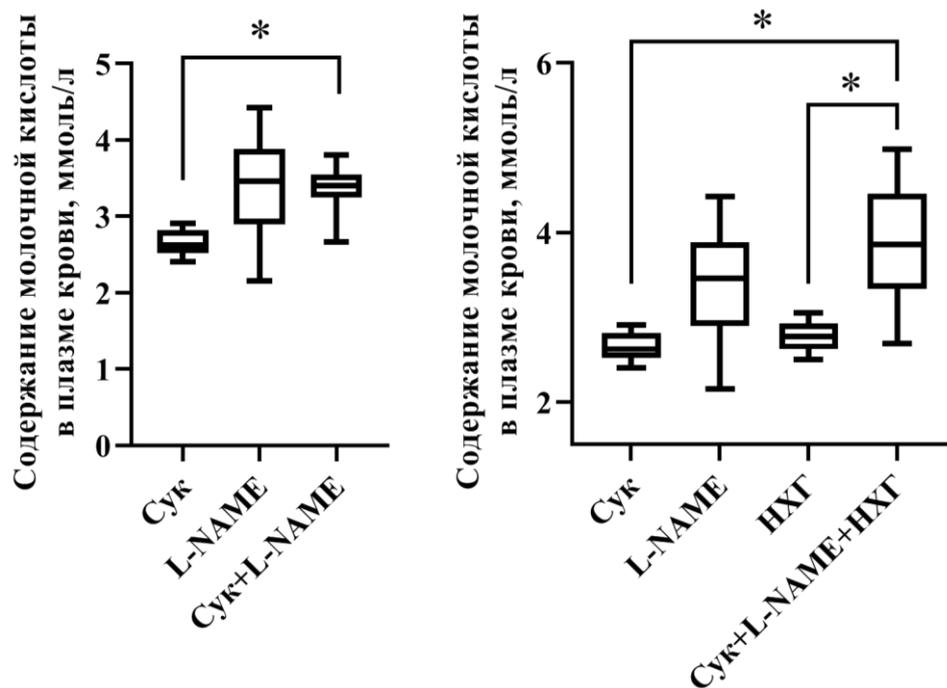


Рисунок 13 – Содержание молочной кислоты в плазме крови при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината

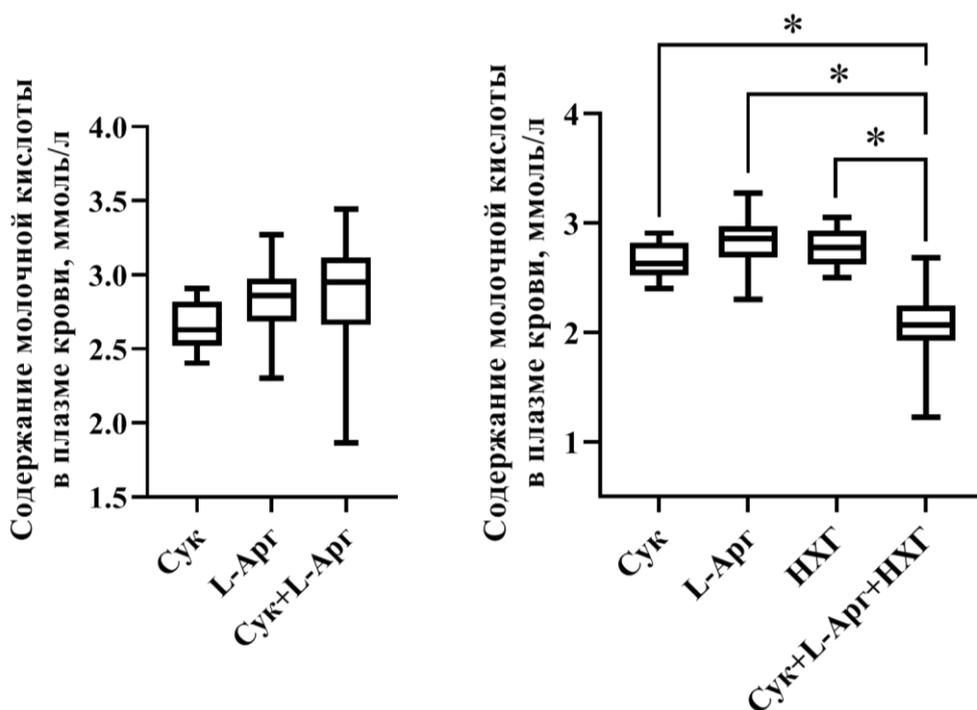


Рисунок 14 – Содержание молочной кислоты в плазме крови при моделировании НХГ и назначении L-аргинина и сукцината

Исходя из полученных данных, можно заключить, что двухнедельные гипоксические тренировки приводили к снижению лактата в плазме крови, и при достаточном уровне оксида азота (II) сукцинат усиливал этот эффект. Дефицит NO обращал действие этих факторов, что указывает на двустороннее влияние оксида азота (II) и сукцината на формирование адаптации к кислорододефициту. Данные других исследований подтверждают вазодилатирующий эффект сукцината, проявляющийся только в условиях достаточного снабжения NO [227].

## **3.2. ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И L-NAME-ОПОСРЕДОВАННОМ ДЕФИЦИТЕ ОКСИДА АЗОТА (II)**

### **3.2.1. Изменение биохимических показателей при нормобарической хронической гипоксии**

При моделировании нормобарической хронической гипоксии отмечалось достоверное снижение количества HIF1 $\alpha$ , 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 $\alpha$  МФ/ЦФ (Таблица 3). В головке придатка яичка достоверных изменений не выявлено.

Известно, что синтез PND индуцируется гипоксией, что способствует быстрой ответной реакции на восстановление уровня кислорода деградацией HIF1 $\alpha$  [143]. Возможно, понижение HIF1 $\alpha$  в экспериментальной группе животных вызвано следующей за дефицитом кислорода реоксигенацией.

Распределение HIF1 $\alpha$  оказалось неоднородно. Из результатов видно, что содержание транскрипционного фактора в условиях нормоксии в головке придатка яичка существенно ниже, чем в хвосте, что согласуется с наблюдениями других авторов [139]. А отличия в накоплении HIF1 $\alpha$  в головке и хвосте эпидидимиса при моделировании НХГ могут указывать на

фундаментальные различия в том, как эти области придатка яичка регулируют гомеостаз кислорода [47].

Таблица 3 – Количество HIF1 $\alpha$  в митохондриальной и цитоплазматической фракциях при моделировании нормобарической хронической гипоксии, в нг/мг белка

Группы	HIF1 $\alpha$ МФ	HIF1 $\alpha$ ЦФ	Соотношение HIF1 $\alpha$ МФ / ЦФ
<b>Семенные пузырьки</b>			
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 <sub>3-4</sub> =0,024*↓	2,99 [2,88; 4,29] p <sub>3-4</sub> =0,16	4,66 [3,38; 5,7] p <sub>3-4</sub> =0,083
<b>Хвост эпидидимиса</b>			
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 <sub>3-4</sub> =0,01*↓	4,3 [3,91; 4,62] p <sub>3-4</sub> =0,014*↑	2,86 [2,42; 3,37] p <sub>3-4</sub> =0,0039*↓

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

В митохондриях семенных пузырьков и хвоста эпидидимиса наблюдалось достоверное снижение концентрации метаболитов оксида азота (II) у животных, подвергшихся НХГ, относительно группы контроля (Рисунок 15).

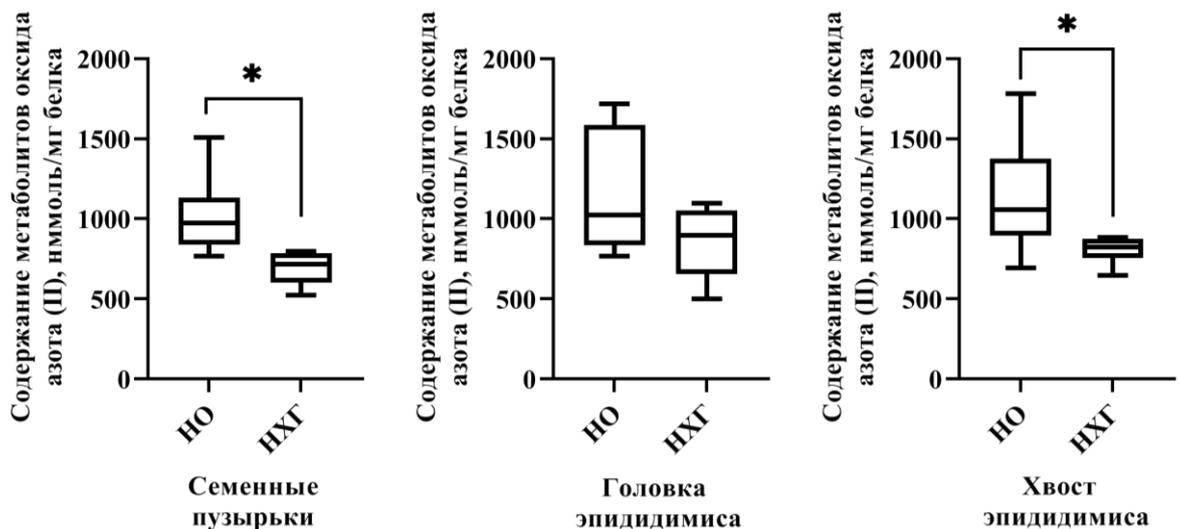


Рисунок 15 – Содержание NO<sub>x</sub> в митохондриях при моделировании нормобарической хронической гипоксии

Понижение концентрации метаболитов NO при НХГ может быть обусловлено несколькими факторами: недостаточность субстрата (кислорода)

для его синтеза, повышенный расход оксида азота (II) вследствие его взаимодействия с железосодержащими ферментами и активными формами кислорода, а также замедление экспрессии ASS под влиянием HIF1, отвечающей за биосинтез аргинина в большинстве тканей организма, следствием чего стало снижение биодоступности этой аминокислоты как субстрата для синтеза NO.

Анализ ферментов и метаболитов энергообмена митохондрий показал, что статистически значимых отличий в изменении активности АТФ-синтазы и сукцинатдегидрогеназы при моделировании НХГ выявлено не было. Однако во всех исследуемых тканях достоверно снижалась активность цитохромоксидазы (Рисунок 16) и концентрация сукцината (Рисунок 17).

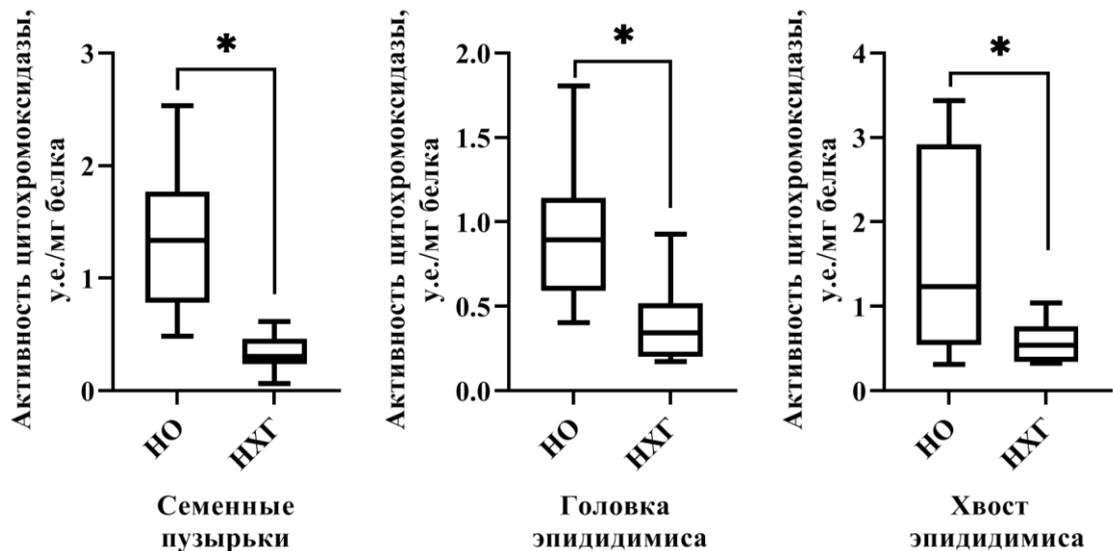


Рисунок 16 – Активность цитохромоксидазы при моделировании нормобарической хронической гипоксии

Ингибирование ЦО в условиях гипоксии необходимо для регуляции уровня кислорода. Механизм сбережения  $O_2$  способствует эффективной утилизации HIF1 $\alpha$  во избежание наступления его отрицательного действия.

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

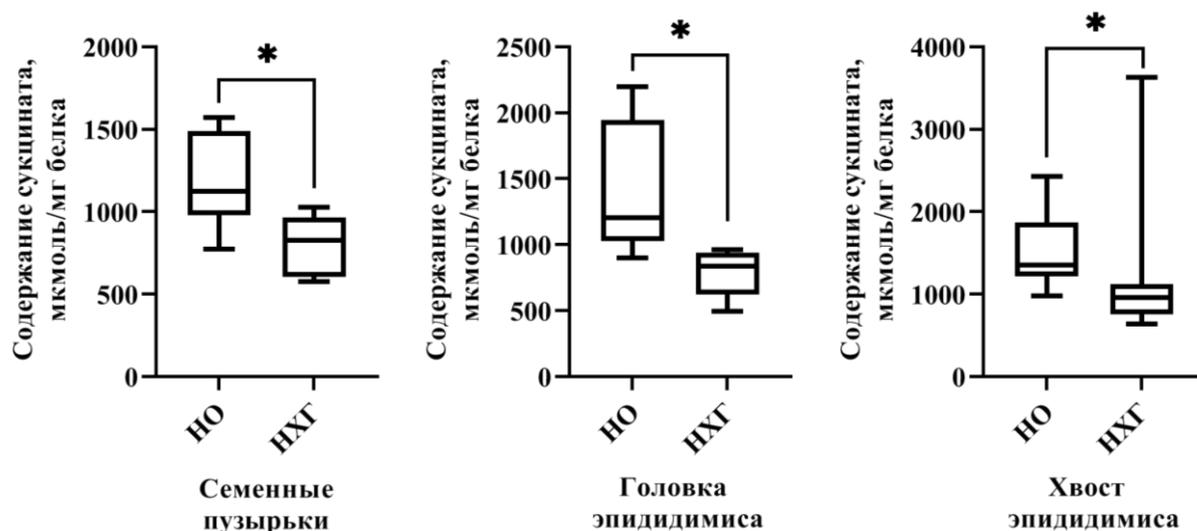


Рисунок 17 – Содержание сукцината в митохондриях при моделировании нормобарической хронической гипоксии

Результаты показали, что моделирование НХГ привело к повышению доли ЛДГ1 в семенных пузырьках без изменений общей активности фермента, а в тканях эпидидимиса – на фоне понижения этого показателя (Таблица 4). При этом отмечалось повышение доли фракции ЛДГх в хвосте придатка яичка только в митохондриях, а в головке – только в цитоплазме.

Таблица 4 – 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 нормобарической хронической гипоксии

Группы	Митохондриальная фракция		Цитоплазматическая фракция			
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	Общая ЛДГ	ЛДГ1		
<b>Семенные пузырьки</b>						
Группа 3: НО	798 [602; 1146]	0,77 [0,56; 1,04]	3061 [2211; 3907]	3,28 [3,02; 3,35]		
Группа 4: НХГ	1124 [1003; 1379] $p_{3-4}=0,21$	2,92 [2,66; 3,23] $p_{3-4}=0,0009* \uparrow$	1272 [1224; 2550] $p_{3-4}=0,13$	3,89 [3,73; 4,11] $p_{3-4}=0,004* \uparrow$		
Группы	Митохондриальная фракция			Цитоплазматическая фракция		
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх
<b>Головка эпидидимиса</b>						
Группа 3: НО	3383 [1659; 4088]	1,06 [0,88; 1,35]	14,66 [13,86; 17,46]	5799 [5431; 6590]	1,39 [1,2; 1,54]	8,99 [4,9; 11,07]

Продолжение Таблицы 4

<b>Группа 4: НХГ</b>	804 [709; 977]  p <sub>3-4</sub> = 0,0013*↓	2,22 [1,83; 2,6]  p <sub>3-4</sub> = 0,014*↑	14,83 [12,65; 17,01]  p <sub>3-4</sub> =0,43	3088 [2247; 3724]  p <sub>3-4</sub> = 0,0001*↓	2,08 [1,81; 2,34]  p <sub>3-4</sub> = 0,0009*↑	13,57 [13,09; 13,8]  p <sub>3-4</sub> = 0,0009*↑
<b>Хвост эпидидимиса</b>						
<b>Группы</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>
<b>Группа 3: НО</b>	2732 [1592; 3140]	3,31 [2,89; 3,69]	12,81 [12,5; 13,12]	7158 [5684; 7359]	4,84 [4,45; 4,93]	12,54 [11,03; 14,96]
<b>Группа 4: НХГ</b>	2882 [2394; 3529]  p <sub>3-4</sub> =0,37	5,03 [4,9; 5,31]  p <sub>3-4</sub> = 0,0009*↑	29,25 [27,31; 29,99]  p <sub>3-4</sub> = 0,0009*↑	3532 [2810; 4327]  p <sub>3-4</sub> = 0,018*↓	6,05 [5,32; 6,71]  p <sub>3-4</sub> = 0,041*↑	10,9 [9,72; 11,43]  p <sub>3-4</sub> =0,23

Примечания – НО – нормоксия, контроль к группе 4; НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии

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 [42].

Содержание лактата в семенных пузырьках при моделировании НХГ менялось разнонаправленно: понижение в митохондриях, но повышение в цитоплазме (Таблица 5).

Таблица 5 – Содержание лактата в митохондриальной и цитоплазматической фракциях семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании нормобарической хронической гипоксии, в мкмоль/мг белка

<b>Группы</b>	<b>Митохондриальная фракция</b>	<b>Цитоплазматическая фракция</b>
<b>Семенные пузырьки</b>		
<b>Группа 3: НО</b>	5,87 [4,62; 6,92]	0,75 [0,62; 0,85]
<b>Группа 4: НХГ</b>	1,76 [1,41; 1,96] p <sub>3-4</sub> =0,0028*↓	1,66 [1,2; 1,99] p <sub>3-4</sub> =0,0085*↑
<b>Головка эпидидимиса</b>		
<b>Группа 3: НО</b>	5,65 [4,38; 7,47]	1,71 [1,19; 1,93]
<b>Группа 4: НХГ</b>	2,64 [2,23; 3,03] p <sub>3-4</sub> =0,0009*↓	1,94 [1,66; 2,2] p <sub>3-4</sub> =0,24

Примечания – НО – нормоксия, контроль к группе 4; НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии

В то же время в эпидидимисе отмечалось понижение этого показателя только в митохондриях проксимального отдела. Данные согласуются с нашими предположениями об участии ЛДГ1 и ЛДГх в метаболизме лактата. Видимо, снижение общей активности ЛДГ, но повышение фракций, обладающих высоким сродством к молочной кислоте, предупреждает развитие лактатного ацидоза. Отличия в реакции на гипоксию между семенными пузырьками и эпидидимисом можно объяснить тем, что лактат для сперматозоидов является предпочтительным субстратом для окисления [178, 181].

### **3.2.2. Изменение биохимических показателей при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II)**

Для моделирования у крыс дефицита оксида азота (II) применялся неселективный ингибитор NOS N( $\omega$ )-нитро-L-аргинин в виде метилового эфира. Известно, что ингибирующий эффект L-NAME для разных тканей проявляется по-разному. Это связано со многими факторами, такими как скорость диффузии, метаболизм самого ингибитора, количество L-аргинина в клетке [17]. Например, доказано, что L-NAME может быть донором оксида азота (II) в реакциях восстановления [117], также способствует образованию NO из L-NAME реакция Фентона [188]. Из-за этого исследование содержания метаболитов NO в крови может быть затруднено, так как присутствие самого L-NAME в пробе, вероятно, приводит к ложноположительному результату. Поэтому оценку количества метаболитов оксида азота (II) проводили только в митохондриях исследуемых тканей.

Результаты показали, что в семенных пузырьках и эпидидимисе наблюдалось достоверное снижение концентрации метаболитов NO у животных, получавших L-NAME, относительно группы контроля (Рисунок 18).

При моделировании L-NAME-опосредованного дефицита NO на фоне НХГ отмечалось достоверное снижение метаболитов оксида азота (II) в митохондриях семенных 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 19).

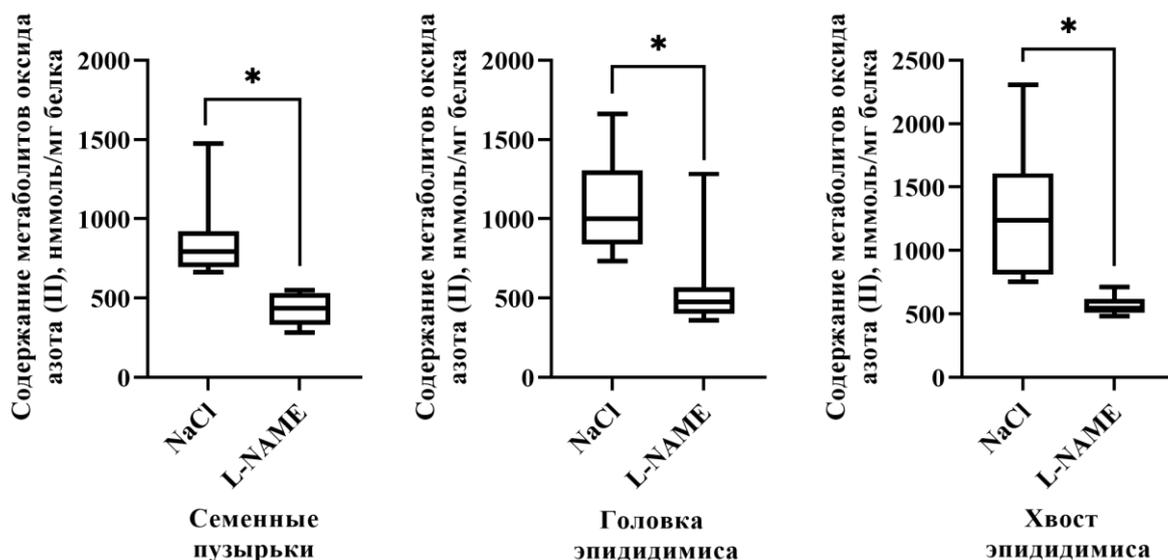


Рисунок 18 – Содержание  $\text{NO}_x$  в митохондриях при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита NO

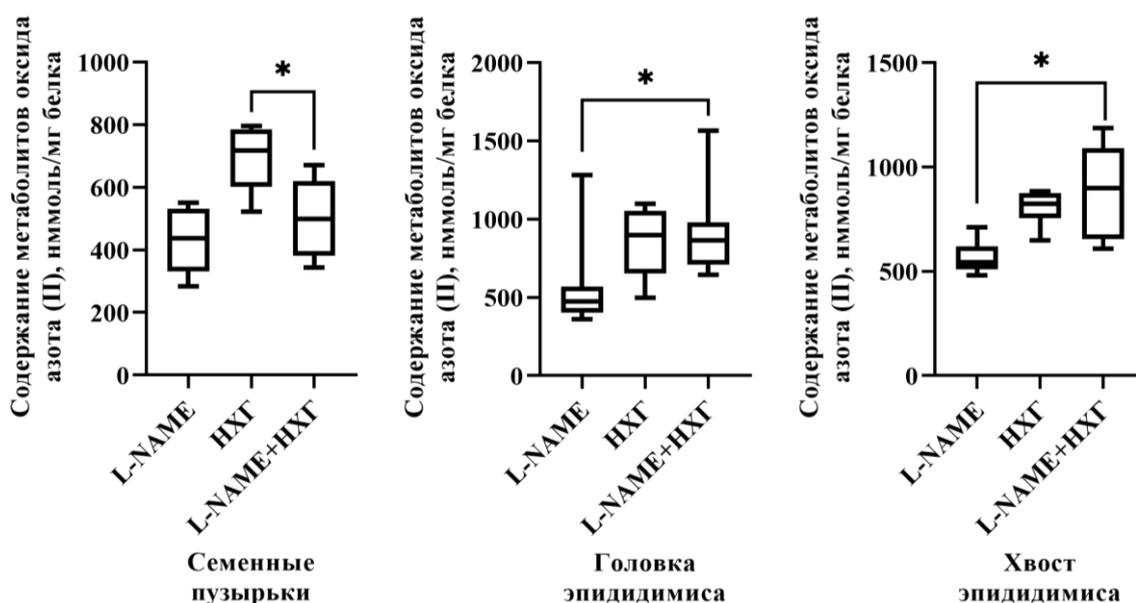


Рисунок 19 – Содержание  $\text{NO}_x$  в митохондриях при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

Поскольку концентрация метаболитов оксида азота (II) одинаково снижалась как при гипоксии, так и при получении животными L-NAME, и реакция была одинаково выражена во всех исследуемых тканях, то результаты, полученные при сочетании этих факторов, позволяют предположить, что в семенных пузырьках на уровень NO сильное влияние оказывает регуляция

синтеза этой молекулы с помощью NOS, в то время как в эпидидимисе пути адаптации к гипоксии задействуют механизмы, высвобождающие NO из его депо – комплексов с ионами металлов.

Активность ЦО у животных, получавших L-NAME, достоверно снижалась во всех исследуемых тканях по сравнению с группой контроля (Рисунок 20). В то же время активность АТФ-синтазы значимо не изменялась и не были выявлены отличия в содержании HIF1 $\alpha$ .

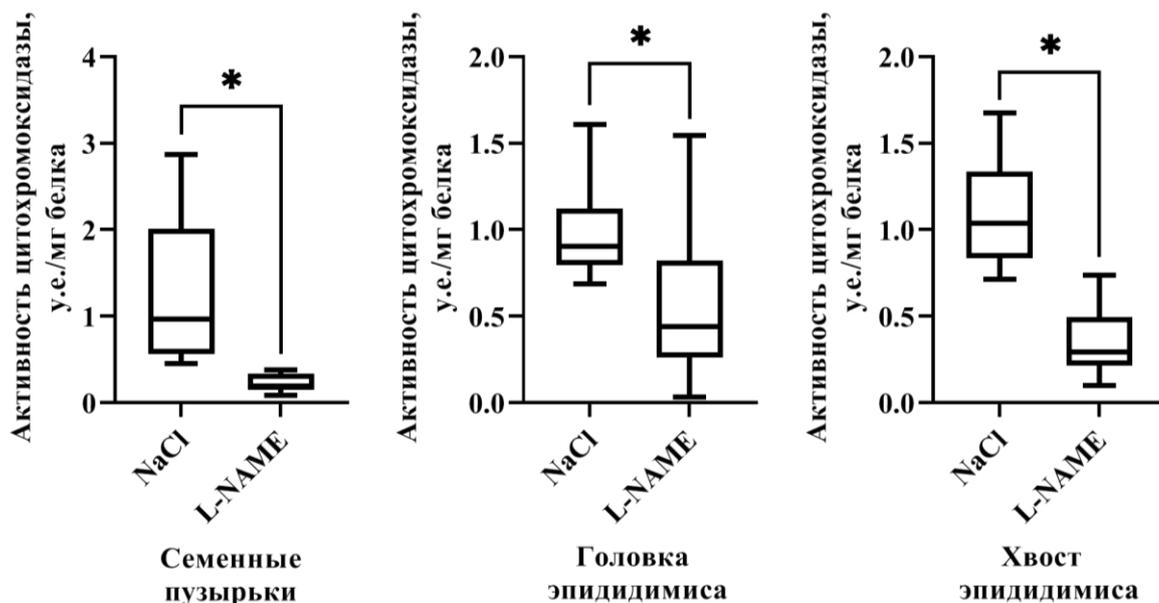


Рисунок 20 – Активность цитохромоксидазы при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита NO

При сочетании гипоксии и L-NAME-опосредованного дефицита NO наблюдалось повышение активности ЦО в хвосте эпидидимиса относительно животных, получавших только L-NAME (Рисунок 21). Результаты исследования активности ЦО косвенно подтверждают наблюдающиеся изменения в уровне метаболитов NO: высокое значение метаболитов NO и активности ЦО в эпидидимисе свидетельствует о том, что связывание оксида азота (II) с железосодержащими ферментами в этих условиях происходит менее активно. Такая же тенденция изменений наблюдалась для АТФ-синтазы (Рисунок 22).

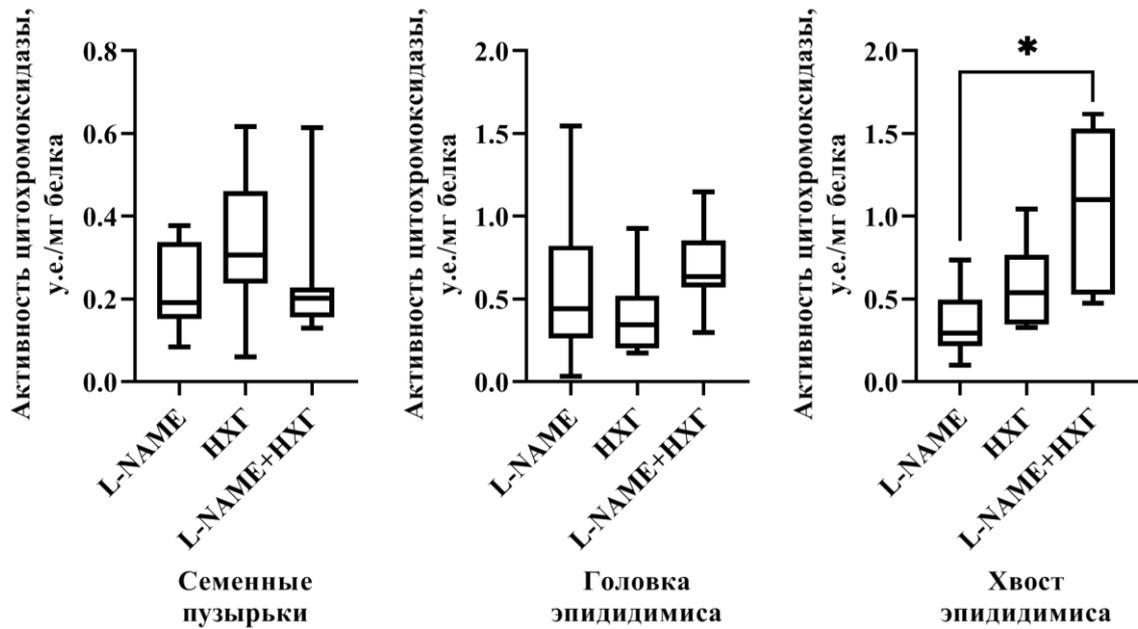


Рисунок 21 – Активность цитохромоксидазы в митохондриях семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

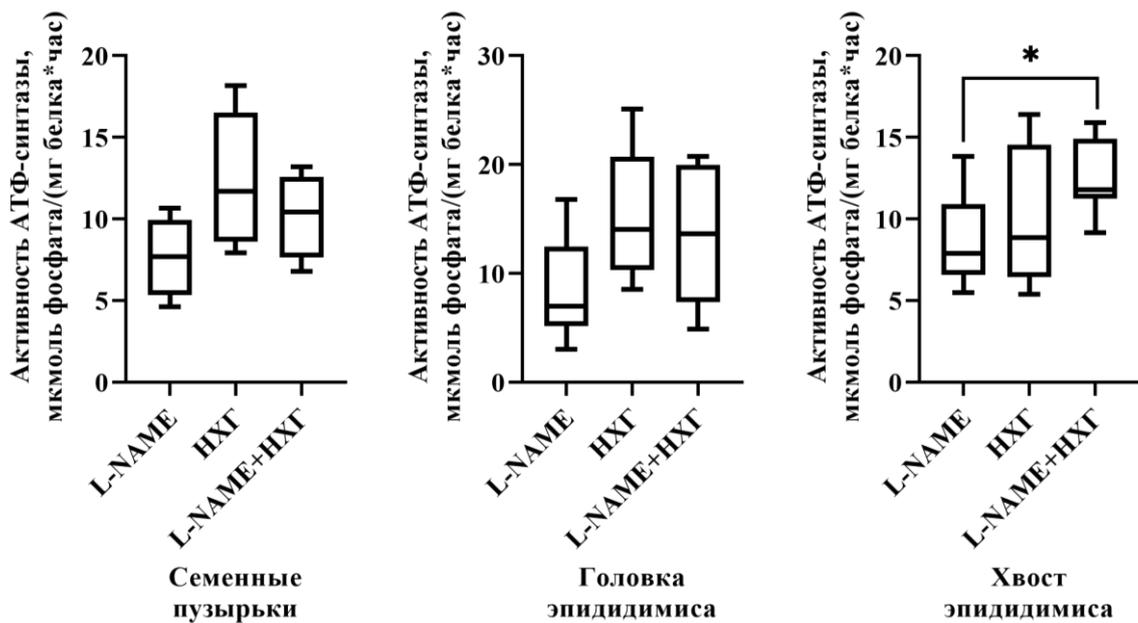


Рисунок 22 – Активность АТФ-синтазы при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

Активность СДГ у животных, получавших L-NAME, по сравнению с группой контроля статистически значимо снижалась только в митохондриях семенных пузырьков (Рисунок 23), что согласуется с литературными данными о регуляции активности этого фермента оксидом азота (II) [97].

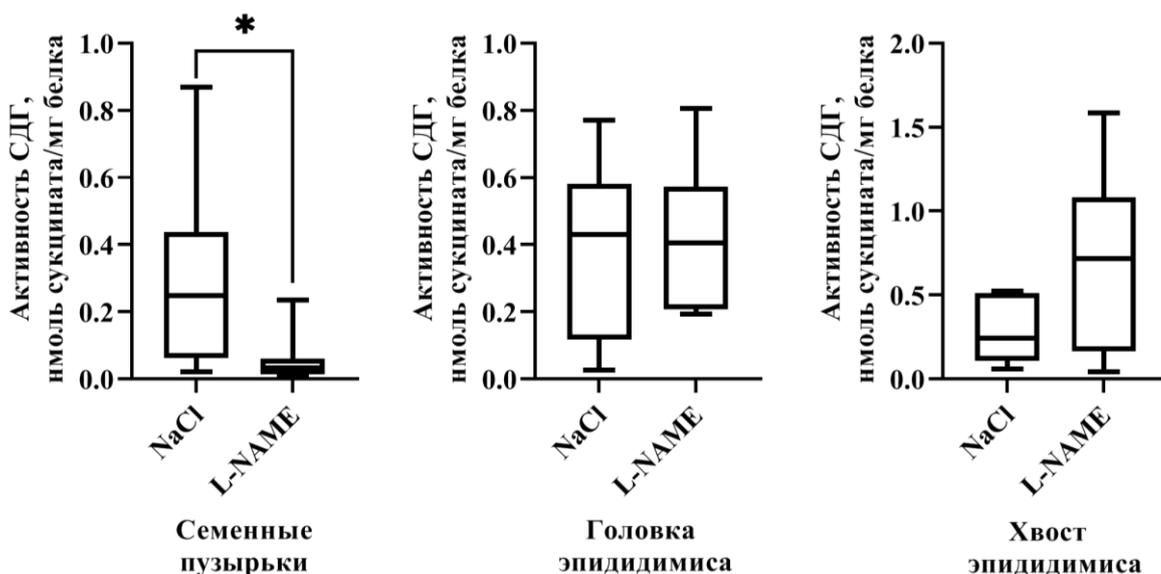


Рисунок 23 – Активность сукцинатдегидрогеназы при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита NO

Концентрация сукцината при этом статистически значимо становилась ниже, чем в группах контроля, как в митохондриях семенных пузырьков, так и в митохондриях головки и хвоста эпидидимиса (Рисунок 24).

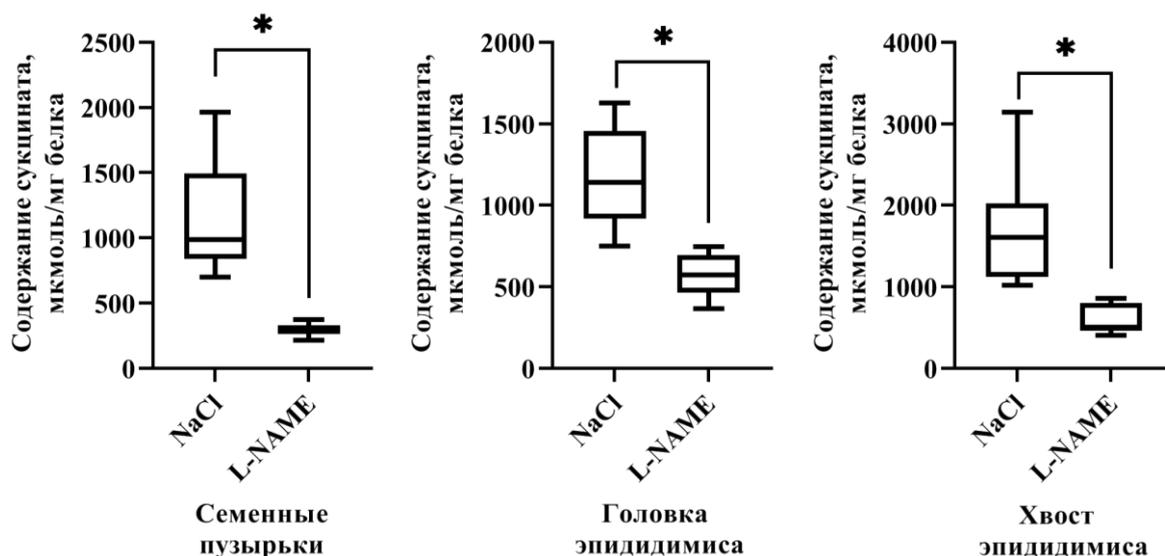


Рисунок 24 – Содержание сукцината в митохондриях при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита NO

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 25).

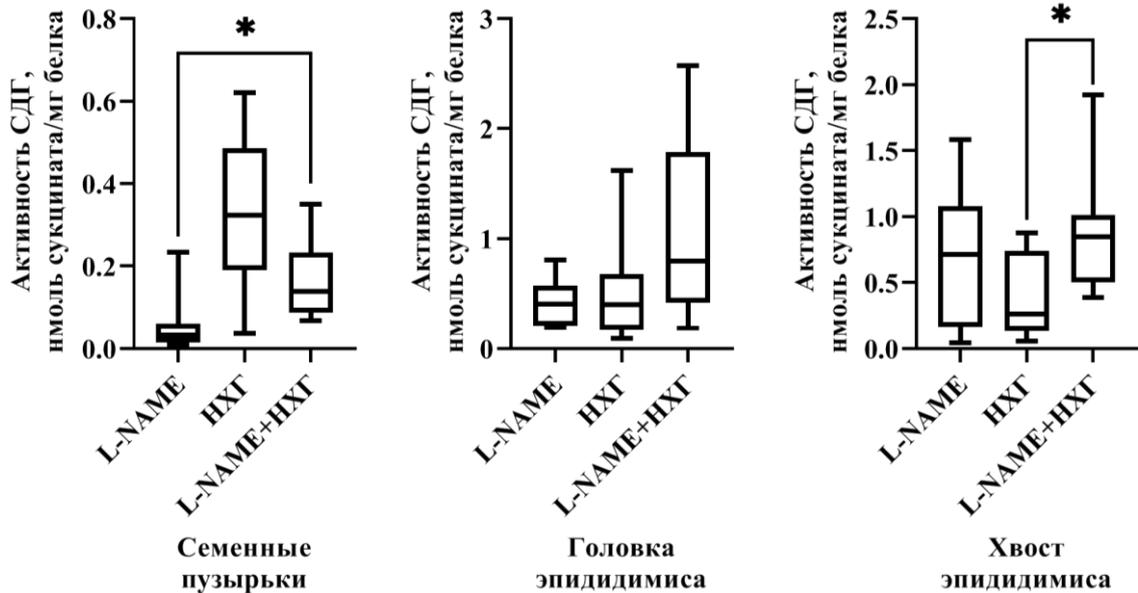


Рисунок 25 – Активность сукцинатдегидрогеназы при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

Тенденция повышения отмечалась и в содержании сукцината во всех тканях относительно серии L-NAME, но в семенных пузырьках уровень метаболита был снижен относительно серии НХГ (Рисунок 26).

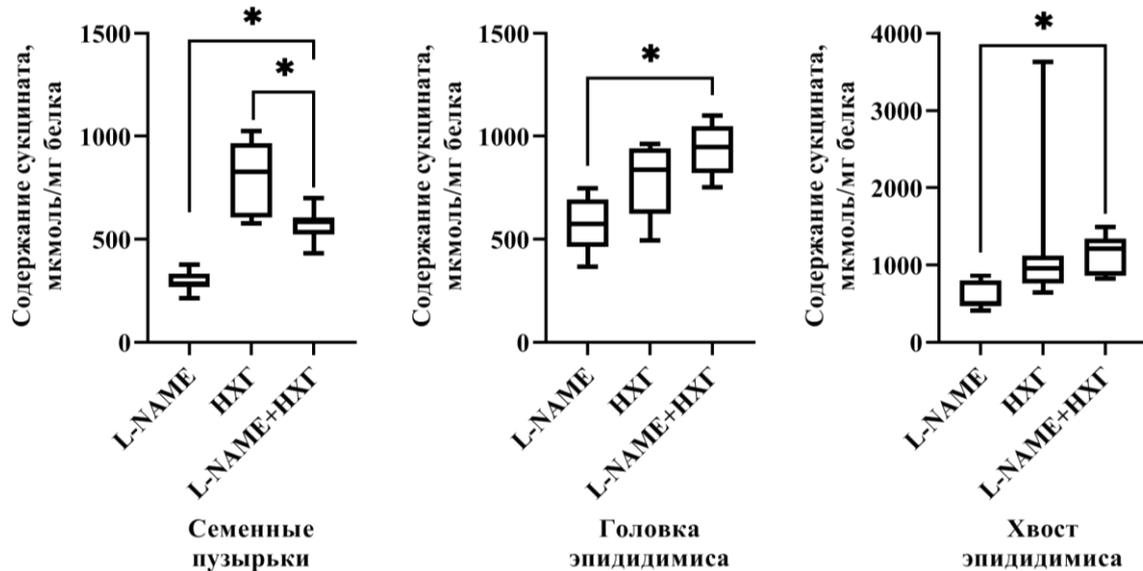


Рисунок 26 – Содержание сукцината в митохондриях при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

Сукцинат может быть как субстратом для СДГ, так и продуктом реверсивной активности этого фермента. Особенно сильно этот эффект проявляется при гипоксии, когда фумарат становится конечным акцептором

электронов вместо кислорода, поддерживая тем самым баланс редокс-пары убихинон-убихинол [256, 258]. Этот режим работы необходим для стабильного окисления жирных кислот, которые являются основным энергетическим субстратом для головки эпидидимиса, способствует накоплению сукцината, который через ГТФ-зависимую SCS направляется на синтез гема [224].

Экспериментальный дефицит оксида азота характеризовался уменьшением общей активности ЛДГ в семенных пузырьках; при этом доля ЛДГ1 повышалась в митохондриях, но снижалась в цитоплазме. Совместное действие L-NAME и гипоксии вызвало ещё более выраженное понижение активности фермента и повышение доли ЛДГ1 в митохондриях семенных пузырьков, статистически значимо отличающееся от группы животных, подвергшихся только гипоксии. Повышение ЛДГ1 ЦФ достоверно относительно обоих вариантов контроля (Таблица 6).

Таблица 6 – 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	Общая ЛДГ	ЛДГ1		
<b>Семенные пузырьки</b>						
<b>Группа 4: НХГ</b>	1124 [1003; 1379]	2,92 [2,66; 3,23]	1272 [1224; 2550]	3,89 [3,73; 4,11]		
<b>Группа 5: NaCl</b>	1140 [741; 2373]	2,78 [2,08; 3,7]	4071 [2823; 5028]	3,98 [3,86; 4,01]		
<b>Группа 6: L-NAME</b>	507 [307; 817] p <sub>5-6</sub> =0,03*↓	5,82 [5,42; 6,2] p <sub>5-6</sub> =0,0009*↑	1125 [709; 1899] p <sub>5-6</sub> =0,003*↓	3,25 [3,15; 3,37] p <sub>5-6</sub> =0,004*↓		
<b>Группа 7: L-NAME+НХГ</b>	373 [221; 676] p <sub>4-7</sub> =0,006*↓ p <sub>6-7</sub> =0,63	5,47 [4,63; 5,92] p <sub>4-7</sub> =0,014*↑ p <sub>6-7</sub> =0,43	1638 [1541; 1776] p <sub>4-7</sub> =0,43 p <sub>6-7</sub> =0,64	4,68 [4,39; 4,9] p <sub>4-7</sub> =0,014*↑ p <sub>6-7</sub> =0,0009*↑		
Группы	Митохондриальная фракция			Цитоплазматическая фракция		
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх

Головка эпидидимиса						
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 5: NaCl</b>	1175 [720; 1838]	2,9 [2,29; 3,21]	17,49 [16,42; 23,67]	3765 [3295; 4511]	2,74 [2,33; 2,85]	16,69 [14,84; 20,86]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	2166 [1812; 3389] p <sub>5-6</sub> = 0,066	1,81 [1,51; 1,88] p <sub>5-6</sub> = 0,04*↓	13,53 [13,36; 13,63] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↓	5098 [3768; 6106] p <sub>5-6</sub> =0,32	0,86 [0,73; 1,01] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↓	8,03 [7,21; 8,6] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↓
<b>Группа 7: L-NAME+ НХГ</b>	3093 [2174; 4039] p <sub>4-7</sub> = 0,003*↑ p <sub>6-7</sub> = 0,37	1,32 [1,13; 1,81] p <sub>4-7</sub> =0,1 p <sub>6-7</sub> =0,71	17,98 [16,68; 19,9] p <sub>4-7</sub> =0,052 p <sub>6-7</sub> =0,04	4779 [4559; 5302] p <sub>4-7</sub> = 0,007*↑ p <sub>6-7</sub> =0,95	1,19 [1,13; 1,48] p <sub>4-7</sub> = 0,0009*↓ p <sub>6-7</sub> = 0,014*↑	9,86 [9,73; 12,2] p <sub>4-7</sub> = 0,0009*↓ p <sub>6-7</sub> = 0,004*↑
Хвост эпидидимиса						
Группы	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 5: NaCl</b>	1685 [902; 2556]	6,79 [6,59; 7]	15,3 [13,97; 15,89]	5289 [4088; 5845]	4,82 [4; 5,7]	10,03 [9,47; 11,31]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	1978 [1596; 2283] p <sub>5-6</sub> =0,43	8,48 [8,43; 8,55] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	26,7 [25,4; 29,07] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	4675 [3688; 5293] p <sub>5-6</sub> =0,79	6,29 [6,07; 6,44] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	8,18 [7,4; 9,25] p <sub>5-6</sub> = 0,041*↓
<b>Группа 7: L-NAME+ НХГ</b>	2556 [1553; 4000] p <sub>4-7</sub> =0,56 p <sub>6-7</sub> =0,96	5,33 [5,04; 5,73] p <sub>4-7</sub> =0,71 p <sub>6-7</sub> = 0,0009*↓	16,56 [13,76; 17,94] p <sub>4-7</sub> = 0,0009*↓ p <sub>6-7</sub> = 0,0009*↓	4483 [3300; 5511] p <sub>4-7</sub> =0,37 p <sub>6-7</sub> =0,87	3,09 [2,73; 4,24] p <sub>4-7</sub> =0,041 p <sub>6-7</sub> =0,1	5,99 [5,79; 6,64] p <sub>4-7</sub> = 0,004*↓ p <sub>6-7</sub> = 0,014*↓

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группам 6; L-NAME – животные, подвергшиеся моделированию дефицита оксида азота (II)

В головке эпидидимиса наблюдалось понижение как доли ЛДГ1, так и доли ЛДГх в обеих фракциях при сохранении общей активности фермента, а в хвосте эпидидимиса наблюдалось обратное изменение активности фермента, за исключением ЛДГх, доля которого также снижалась. Сочетанное влияние

гипоксии и L-NAME привело к снижению обеих фракций ЛДГх хвоста придатка яичка, но в головке эпидидимиса общая активность фермента увеличилась, а доля ЛДГ1 и ЛДГх ЦФ оказалась ниже относительно гипоксии, но выше относительно L-NAME (Таблица 6).

Получение животными ингибитора NOS вызвало повышение содержания лактата в цитоплазме обоих отделов эпидидимиса, но не привело к достоверным изменениям в семенных пузырьках (Таблица 7).

Таблица 7 – 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
<b>Семенные пузырьки</b>		
Группа 4: НХГ	1,76 [1,41; 1,96]	1,66 [1,2; 1,99]
Группа 5: NaCl	4,76 [3,96; 7,76]	0,95 [0,61; 1,86]
Группа 6: L-NAME	3,02 [1,91; 4,86] p <sub>5-6</sub> =0,08	2,04 [1,6; 2,7] p <sub>5-6</sub> =0,13
Группа 7: L-NAME+НХГ	5,28 [3,02; 7,23] p <sub>4-7</sub> =0,01*↑ p <sub>6-7</sub> =0,16	1,08 [0,89; 1,17] p <sub>4-7</sub> =0,07 p <sub>6-7</sub> =0,007*↓
<b>Головка эпидидимиса</b>		
Группа 4: НХГ	2,64 [2,23; 3,03]	1,94 [1,66; 2,2]
Группа 5: NaCl	4,47 [3,84; 5,92]	1,4 [0,96; 1,83]
Группа 6: L-NAME	3,73 [3,56; 6,27] p <sub>5-6</sub> =0,56	2,12 [1,69; 2,29] p <sub>5-6</sub> =0,024*↑
Группа 7: L-NAME+НХГ	4,23 [2,58; 5,9] p <sub>4-7</sub> =0,13 p <sub>6-7</sub> =0,43	2,39 [1,4; 3,28] p <sub>4-7</sub> =0,56 p <sub>6-7</sub> =0,71
<b>Хвост эпидидимиса</b>		
Группа 4: НХГ	4,38 [2,75; 6,55]	1,6 [1,58; 1,65]
Группа 5: NaCl	6,76 [4,96; 8,77]	1,12 [0,77; 1,49]
Группа 6: L-NAME	4,52 [3,73; 6,47] p <sub>5-6</sub> =0,23	2,34 [1,98; 2,64] p <sub>5-6</sub> =0,04*↑
Группа 7: L-NAME+НХГ	6,88 [3,51; 10,17] p <sub>4-7</sub> =0,37 p <sub>6-7</sub> =0,71	3,31 [2,64; 3,82] p <sub>4-7</sub> =0,0019*↑ p <sub>6-7</sub> =0,052

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группам 6; L-NAME – животные, подвергшиеся моделированию дефицита оксида азота (II)

При моделировании гипоксии на фоне экспериментального дефицита NO концентрация лактата увеличивалась в митохондриях семенных пузырьков и цитоплазме хвоста придатка яичка (Таблица 7).

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

Исходя из представленных данных, можно заключить, что в условиях физиологического образования оксида азота (II) основной стратегией адаптации к кислорододефициту в семенных пузырьках и эпидидимисе является переход к анаэробному окислению субстратов, с быстрым переключением на аэробный тип метаболизма при реоксигенации. Подтверждением данного предположения служат снижение активности цитохромоксидазы, повышение изоформ лактатдегидрогеназы, использующих в качестве субстрата лактат, а также снижение концентрации внутримитохондриального лактата. При этом отмечается заметное снижение количества метаболитов NO, что может указывать на его расходование вследствие участия в адаптационных процессах.

Наблюдаемые изменения при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита NO и НХГ свидетельствуют об отклонении путей адаптации к гипоксии от описываемого переключения на анаэробный тип метаболизма. Так, повышение активности ферментов ЭТЦ, понижение концентрации сукцината и высокий уровень метаболитов оксида азота (II), изменение соотношения изоформ ЛДГ и скорости накопления лактата указывают на активацию процессов окислительного фосфорилирования, что можно рассматривать как

стратегию развития адаптационных изменений в условиях нарушения регуляции метаболизма с помощью NO.

### 3.3. ИЗМЕНЕНИЕ СТЕПЕНИ КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ ГИПОКСИИ И L-NAME-ОПОСРЕДОВАННОМ ДЕФИЦИТЕ ОКСИДА АЗОТА (II)

#### 3.3.1. Изменение степени карбонилирования белков при нормобарической хронической гипоксии

Для оценки окислительной модификации белков мы определяли степень карбонилирования белков по площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот [79]. 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 (Таблица 8). В митохондриях хвоста эпидидимиса достоверных изменений изучаемых параметров не выявлено.

В головке эпидидимиса отмечено значительное возрастание общей площади под кривой (в 17,8 раза по сравнению с контрольной группой). Особенно выражено увеличение доли альдегидов нейтрального характера, считающиеся первичными маркёрами развития окислительного стресса, приводящего к фрагментации белков [48].

Таблица 8 – Площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот в белках митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании нормобарической хронической гипоксии, в у.е./мг белка

Группы	S <sub>АДНФГ нейт</sub>	S <sub>АДНФГ осн</sub>	S <sub>КДНФГ нейт</sub>	S <sub>КДНФГ осн</sub>	Собщ
<b>Семенные пузырьки</b>					
<b>Группа 3: НО</b>	6,83 [5; 9,7]	0,56 [0,1; 1,24]	1,92 [1,28; 2,74]	0,05 [0,01; 1,11]	9,33 [6,23; 14,29]
<b>Группа 4: НХГ</b>	16,48 [13,64; 18,14] p <sub>3-4</sub> = 0,014*↑	2,87 [2,68; 3,38] p <sub>3-4</sub> = 0,0014*↑	4,24 [3,38; 4,48] p <sub>3-4</sub> =0,0054*↑	0,44 [0,39; 0,53] p <sub>3-4</sub> =0,0009*↑	24,76 [20,08; 26,08] p <sub>3-4</sub> =0,01*↑

Головка эпидидимиса					
<b>Группа 3: НО</b>	13,12 [10,59; 17,59]	1,7 [1,43; 3,44]	3,08 [2,76; 4,93]	0,28 [0,19; 0,49]	17,89 [15,31; 27,62]
<b>Группа 4: НХГ</b>	295,2 [228,97; 336,5] $p_{3-4}=$ 0,0009* $\uparrow$	8,77 [6,27; 10,62] $p_{3-4}=$ 0,0014* $\uparrow$	11,86 [7,36; 12,64] $p_{3-4}=0,0009*$ $\uparrow$	1,46 [1,07; 1,85] $p_{3-4}=0,0014*$ $\uparrow$	319,12 [241; 363,6] $p_{3-4}=$ 0,0009* $\uparrow$

Примечания – НО – нормоксия, контроль к группе 4; НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии. Здесь и далее по тексту:  $S_{\text{АДНФГ}_{\text{нейт}}}$  – площадь под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов альдегидных производных аминокислот нейтрального характера;  $S_{\text{АДНФГ}_{\text{осн}}}$  – площадь под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов альдегидных производных аминокислот основного характера;  $S_{\text{КДНФГ}_{\text{нейт}}}$  – площадь под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов кетоновых производных аминокислот нейтрального характера;  $S_{\text{КДНФГ}_{\text{осн}}}$  – площадь под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов кетоновых производных аминокислот основного характера;  $S_{\text{общ}}$  – общая площадь под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов аминокислотных остатков белков

Ещё одной важной характеристикой оценки окислительного стресса служит резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков (РАП). Достоверное различие в изменении РАП отмечено также только в семенных пузырьках и головке придатка яичка (Рисунок 27).

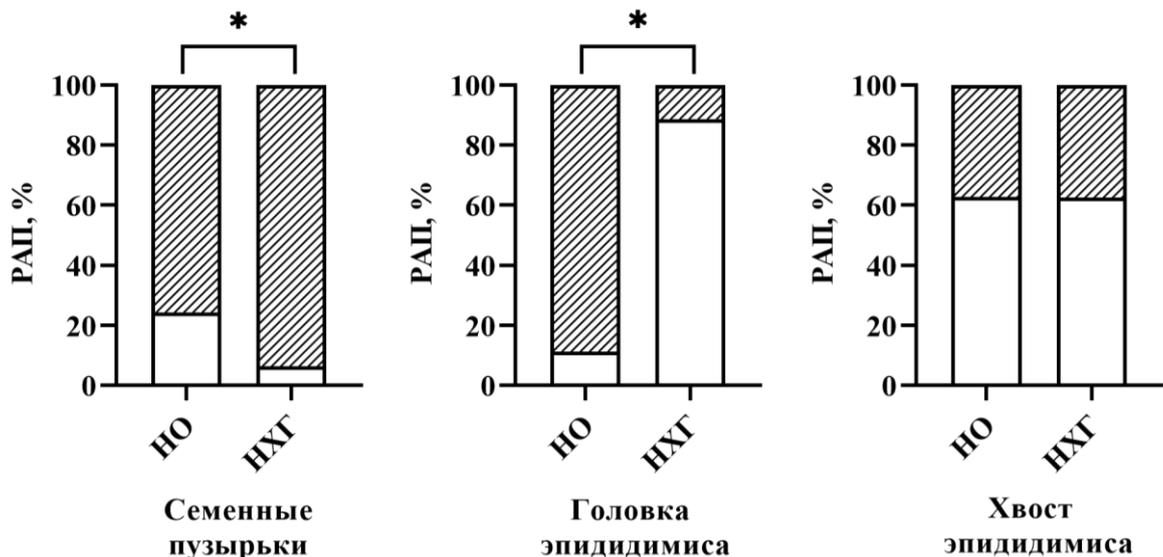


Рисунок 27 – Сравнение изменения резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий (РАП) при моделировании нормобарической хронической гипоксии

Примечания – здесь и далее по тексту \* – показаны только статистически значимые отличия между сравниваемыми группами; 100% – металл-зависимая ОМБ, моделируемая в лабораторных условиях; свободная от штриховки часть шкалы – доля спонтанной ОМБ от металл-зависимой (%); заштрихованная часть шкалы – резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков (доля потенциально-возможной ОМБ)

В семенных пузырьках доля спонтанной модификации при НХГ оказалась ниже, что привело к увеличению РАП, а в головке эпидидимиса наблюдалось снижение этого показателя.

Поскольку ключевую роль в развитии окислительного стресса играют скорость накопления АФК и эффективность антиоксидантных ферментов, важно проанализировать изменение активности СОД в данных условиях. Как видно из результатов, НХГ привела к снижению активности этого фермента во всех исследуемых органах по сравнению с группой контроля (Рисунок 28).

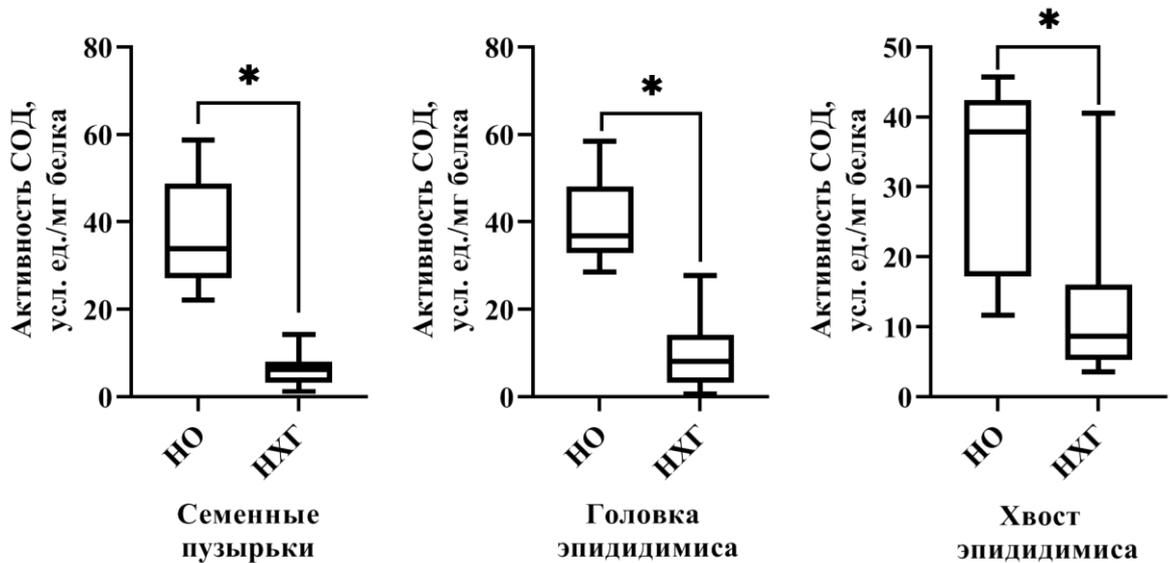


Рисунок 28 – Активность супероксиддисмутазы при моделировании нормобарической хронической гипоксии

### 3.3.2. Изменение степени карбонилирования белков при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II)

В условиях дефицита NO наблюдалось повышение всех показателей ОМБ в митохондриях головки и хвоста эпидидимиса, а также семенных пузырьков, где исключением являлись АДНФГнейт, повышение которых было в пределах тенденции (Таблица 9). Сочетание дефицита оксида азота (II) и НХГ в семенных пузырьках и головке придатка яичка характеризуется меньшим накоплением продуктов ОМБ. В хвосте придатка яичка установлена тенденция к снижению общей окислительной модификации белков, при этом

статистически значимые изменение зафиксированы в частях спектра, соответствующих АДНФГнейт и КДНФГосн (Таблица 9).

Таблица 9 – Площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот в белках митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO, в у.е./мг белка

Группы	S <sub>АДНФГ нейт</sub>	S <sub>АДНФГ осн</sub>	S <sub>КДНФГ нейт</sub>	S <sub>КДНФГ осн</sub>	Собщ
<b>Семенные пузырьки</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	16,48 [13,64; 18,14]	2,87 [2,68; 3,38]	4,24 [3,38; 4,48]	0,44 [0,39; 0,53]	24,76 [20,08; 26,08]
<b>Группа 5: NaCl</b>	8,15 [7,71; 9,55]	0,8 [0,75; 1,02]	2,38 [2,25; 2,55]	0,09 [0,08; 0,15]	11,42 [10,78; 13,45]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	10,27 [9,52; 12,4] p <sub>5-6</sub> =0,05	2,21 [2,06; 2,39] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	3,02 [2,81; 3,155] p <sub>5-6</sub> =0,024*↑	0,30 [0,278; 0,32] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	15,96 [14,69; 18,04] p <sub>5-6</sub> = 0,007*↑
<b>Группа 7: L-NAME +НХГ</b>	10,73 [10,08; 12,17] p <sub>4-7</sub> = 0,007*↓ p <sub>6-7</sub> =0,64	2,04 [1,97; 2,45] p <sub>4-7</sub> =0,07 p <sub>6-7</sub> =0,64	2,77 [2,67; 3,14] p <sub>4-7</sub> =0,03 p <sub>6-7</sub> =0,56	0,28 [0,25; 0,4] p <sub>4-7</sub> =0,03 p <sub>6-7</sub> =0,79	16,46 [15,03; 17,92] p <sub>4-7</sub> =0,013*↓ p <sub>6-7</sub> =1
<b>Головка эпидидимиса</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	295,2 [228,97; 336,5]	8,77 [6,27; 10,62]	11,86 [7,36; 12,64]	1,46 [1,07; 1,85]	319,12 [241; 363,6]
<b>Группа 5: NaCl</b>	8,88 [7,88; 10,04]	0,86 [0,81; 1,23]	1,68 [1,46; 1,97]	0,152 [0,12; 0,19]	11,81 [10,14; 13,38]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	12,24 [10,72; 14,81] p <sub>5-6</sub> = 0,024*↑	3,02 [2,64; 3,33] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	3,9 [3,37; 4,14] p <sub>5-6</sub> = 0,0019*↑	0,44 [0,35; 0,49] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	19,33 [16,72; 22,78] p <sub>5-6</sub> = 0,003*↑
<b>Группа 7: L-NAME +НХГ</b>	25,6 [19,02; 27,89] p <sub>4-7</sub> = 0,0009*↓ p <sub>6-7</sub> =0,018	5,13 [3,77; 6,12] p <sub>4-7</sub> =0,041 p <sub>6-7</sub> = 0,014*↑	7,73 [6,46; 8,52] p <sub>4-7</sub> =0,23 p <sub>6-7</sub> =0,007*↑	0,7 [0,54; 0,92] p <sub>4-7</sub> =0,014*↓ p <sub>6-7</sub> =0,1	39,89 [29,25; 43,17] p <sub>4-7</sub> = 0,0009*↓ p <sub>6-7</sub> =0,018
<b>Хвост эпидидимиса</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	28,84 [24,19; 30]	5,16 [4,9; 6,09]	6,46 [6,09; 7,03]	0,849 [0,71; 0,9]	41,28 [36,4; 43,57]
<b>Группа 5: NaCl</b>	5,35 [3,49; 6,01]	2,11 [1,81; 2,19]	2,54 [2,49; 2,7]	0,31 [0,3; 0,36]	10,37 [7,94; 11,18]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	12,33 [11,69; 16,51] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	4,04 [3,24; 5,73] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑	4,99 [4,27; 6,18] p <sub>5-6</sub> =0,0009*↑	0,67 [0,5; 0,87] p <sub>5-6</sub> =0,0019*↑	22,77 [19,76; 27,51] p <sub>5-6</sub> = 0,0009*↑

Продолжение Таблицы 9

<b>Группа 7: L-NAME +НХГ</b>	17,61 [15,28; 19,2] p <sub>4-7</sub> =0,041 p <sub>6-7</sub> =0,083	4,08 [3,58; 5,38] p <sub>4-7</sub> =0,16 p <sub>6-7</sub> =0,64	6,29 [5,87; 7,76] p <sub>4-7</sub> =0,96 p <sub>6-7</sub> =0,083	0,46 [0,36; 0,61] p <sub>4-7</sub> =0,024 p <sub>6-7</sub> =0,19	29,99 [27,06; 30,77] p <sub>4-7</sub> =0,052 p <sub>6-7</sub> =0,16
--------------------------------------	--	--	---	---	--

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группам 6; L-NAME – животные, подвергшиеся моделированию дефицита оксида азота (II)

Эффект дефицита NO проявился не только в повышении ОМБ, но и в снижении РАП в митохондриях всех изучаемых тканей (Рисунок 29).

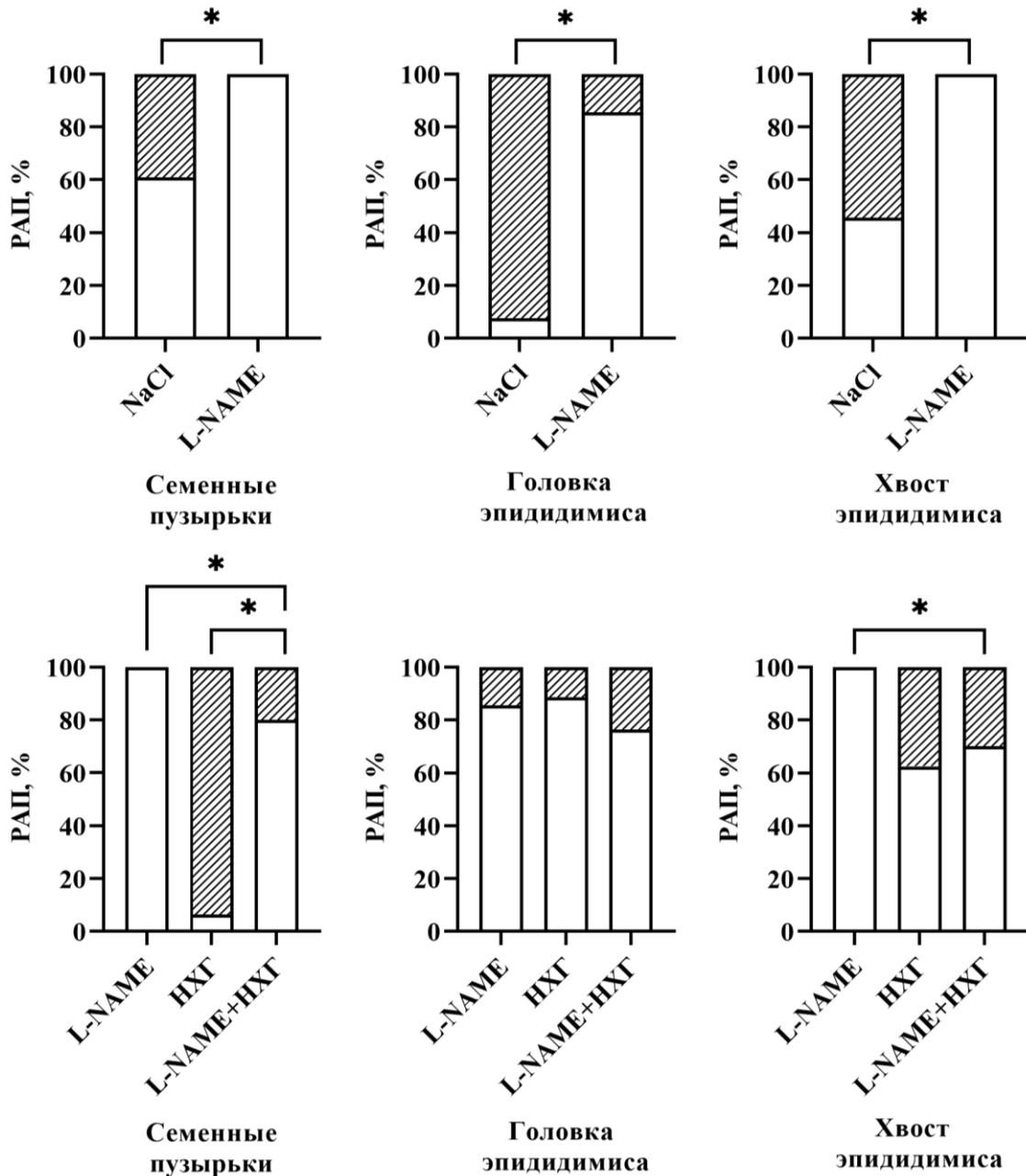


Рисунок 29 – Сравнение изменения резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий (РАП) при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

На фоне гипоксии в семенных пузырьках и хвосте эпидидимиса РАП снижался относительно состояния дефицита NO; в головке придатка яичка значительных отличий показателя выявлено не было.

При L-NAME-опосредованном дефиците NO активность СОД в митохондриях семенных пузырьков достоверно снижалась относительно контроля (Рисунок 30). В условиях гипоксии и при введении L-NAME отмечено повышение активности фермента в семенных пузырьках и хвосте придатка яичка (Рисунок 30).

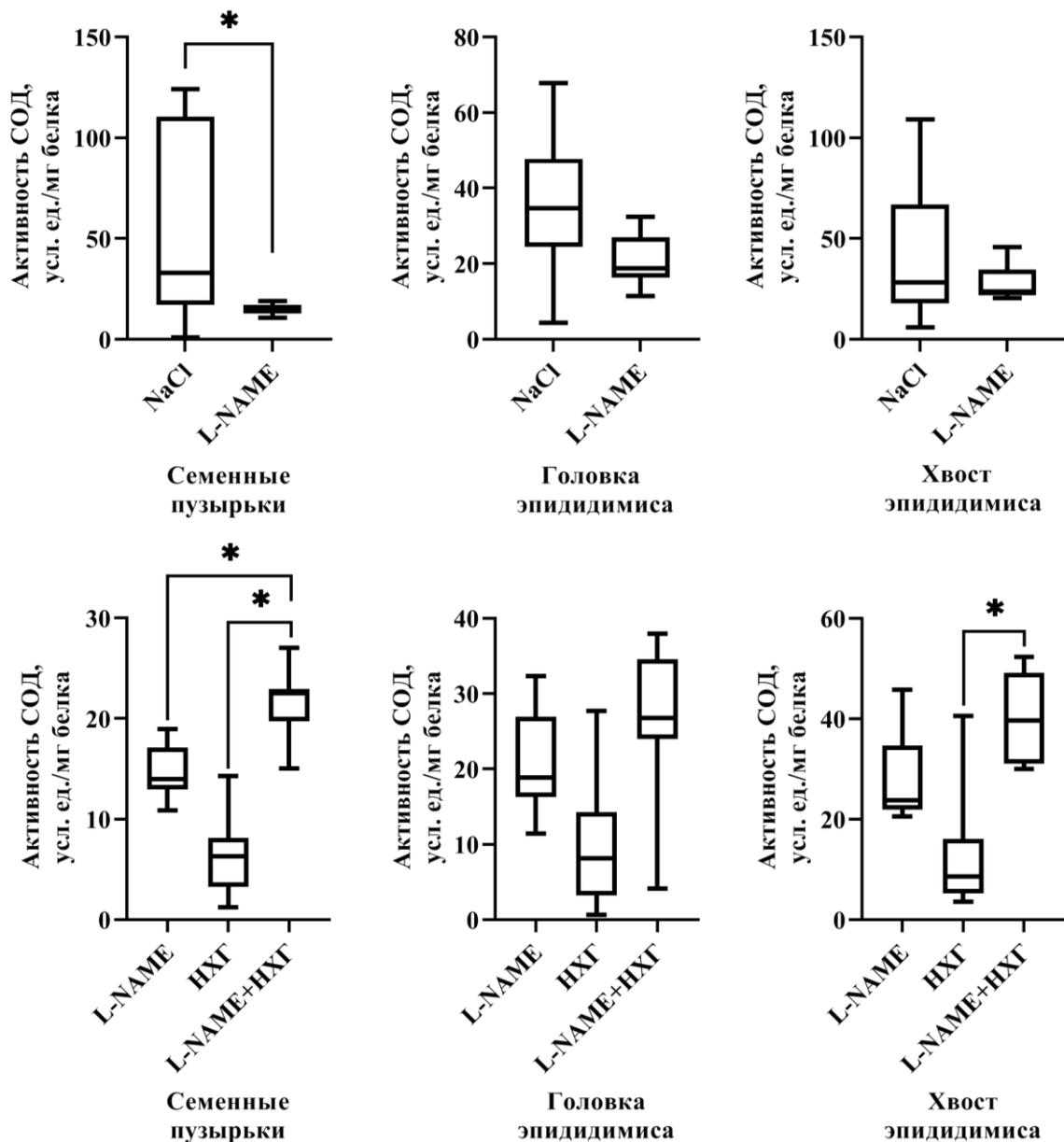


Рисунок 30 – Активность супероксиддисмутазы при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

Окислительная модификация белков (ОМБ) – естественный процесс изменения белковых молекул, скорость которого коррелирует со степенью окислительного стресса. Резкое повышение содержания альдегидных производных аминокислот в головке эпидидимиса характеризует развитие карбонильного стресса в ответ на НХГ. Так как уровень РАП определяется по металл-зависимой реакции, можно предположить, что снижение этого показателя в головке эпидидимиса будет свидетельствовать о высокой степени участия металлов переменной валентности в повреждении аминокислот, в частности, лизина, метионина и цистеина [79].

Очевидно, в регуляции окислительно-восстановительного статуса митохондрий изучаемых тканей важную роль играет именно пул оксида азота (II) [280]. Отметим, что в семенных пузырьках и хвосте эпидидимиса уровень оксида азота (II) достоверно снижался при моделировании НХГ (Рисунок 12), при этом РАП либо повышался, либо не изменялся вовсе (Рисунок 27), что противоположно результатам, полученным при анализе митохондрий головки придатка яичка. Возможно, в этом случае способность NO образовывать комплексы с металлами [7] лежит в основе регуляции окислительного повреждения белков. В пользу нашего предположения свидетельствуют результаты исследования РАП при L-NAME-опосредованном дефицитом NO, где снижение метаболитов оксида азота (II) обусловлено ингибированием синтеза, а, следовательно, созданы условия для металл-зависимого повреждения белков.

Адаптация к условиям кислорододефицита происходит, в том числе за счёт изменения белкового профиля клеток [15], что может повлечь за собой увеличение количества мишеней для модификации, а, следовательно, повышение как спонтанной ОМБ, так и РАП, наблюдаемые в экспериментальной серии L-NAME+НХГ [44]. Кроме того, дефицит NO на фоне гипоксии позволил сохранить активность СОД относительно эксперимента по моделированию НХГ, что также повлияло на скорость накопления ОМБ.

### 3.4. ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И В УСЛОВИЯХ НАЗНАЧЕНИЯ L-АРГИНИНА, КАК СУБСТРАТА ДЛЯ СИНТЕЗА NO

Получение животными экзогенного L-аргинина вызывало уменьшение содержания HIF1 $\alpha$  в митохондриальной фракции всех исследуемых тканей, повышение ЦФ наблюдалось только в семенных пузырьках и хвосте эпидидимиса (Таблица 10).

Таблица 10 – Количество HIF1 $\alpha$  в митохондриальной и цитоплазматической фракциях при моделировании НХГ и назначении L-аргинина, в нг/мг белка

Группы	HIF1 $\alpha$ МФ	HIF1 $\alpha$ ЦФ	Соотношение HIF1 $\alpha$ МФ / ЦФ
<b>Семенные пузырьки</b>			
<b>Группа 4: НХГ</b>	14,84 [11,57; 19,94]	2,99 [2,88; 4,29]	4,66 [3,38; 5,7]
<b>Группа 5: NaCl</b>	23,58 [20,36; 30,43]	3,13 [2,94; 4,5]	7,03 [4,48; 10,64]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	12,95 [9,6; 17,7] p <sub>5-8</sub> =0,01*↓	7,17 [4,96; 8,2] p <sub>5-8</sub> =0,01*↑	2,01 [1,21; 3,28] p <sub>5-8</sub> =0,0054*↓
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	10,49 [8,92; 13,06] p <sub>4-9</sub> =0,16 p <sub>8-9</sub> =0,16	5,26 [4,68; 6,22] p <sub>4-9</sub> =0,0074*↑ p <sub>8-9</sub> =0,43	1,81 [1,67; 2,37] p <sub>4-9</sub> =0,0019*↓ p <sub>8-9</sub> =0,96
<b>Головка эпидидимиса</b>			
<b>Группа 4: НХГ</b>	12,23 [10,02; 16,82]	3,88 [2,8; 4,13]	3,73 [3,37; 3,99]
<b>Группа 5: NaCl</b>	12,36 [10,58; 15,5]	3,2 [2,37; 3,27]	4,18 [3,7; 5,32]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	5,94 [5,6; 7,44] p <sub>5-8</sub> =0,0019*↓	2,73 [2,32; 3,11] p <sub>5-8</sub> =0,32	2,5 [1,92; 2,86] p <sub>5-8</sub> =0,0039*↓
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	16,16 [15,49; 17,08] p <sub>4-9</sub> =0,16 p <sub>8-9</sub> =0,0009*↑	3,77 [3,51; 4,83] p <sub>4-9</sub> =0,71 p <sub>8-9</sub> =0,0074*↑	4,41 [3,34; 4,76] p <sub>4-9</sub> =0,37 p <sub>8-9</sub> =0,0087*↑
<b>Хвост эпидидимиса</b>			
<b>Группа 4: НХГ</b>	12,83 [11,11; 13,65]	4,3 [3,91; 4,62]	2,86 [2,42; 3,37]
<b>Группа 5: NaCl</b>	21,3 [16,99; 24,29]	3,08 [2,66; 3,91]	6,96 [4,97; 9,72]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	8,82 [7,78; 10,51] p <sub>5-8</sub> =0,0019*↓	4,06 [3,91; 4,65] p <sub>5-8</sub> =0,024*↑	2,16 [1,9; 2,45] p <sub>5-8</sub> =0,0009*↓
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	12,27 [9,81; 14,25] p <sub>4-9</sub> =0,32 p <sub>8-9</sub> =0,08	6,16 [4,69; 6,44] p <sub>4-9</sub> =0,13 p <sub>8-9</sub> =0,1	1,94 [1,49; 3,76] p <sub>4-9</sub> =0,1 p <sub>8-9</sub> =0,64

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группам 8; L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргинина

Сочетание НХГ и L-Арг в семенных пузырьках привело к повышению HIF1 $\alpha$  ЦФ относительно только экспериментального кислорододефицита, в головке эпидидимиса – к увеличению показателя относительно серии животных, получавших только L-аргинин, но в хвосте придатка яичка достоверных изменений выявлено не было. Такие изменения отразились и на понижении значения отношения HIF1 $\alpha$  МФ к HIF1 $\alpha$  ЦФ в семенных пузырьках, но в головке придатка яичка L-аргинин на фоне гипоксии изменил это соотношение в пользу повышения митохондриальной фракции.

В митохондриях семенных пузырьков и хвоста эпидидимиса наблюдалось достоверное снижение концентрации метаболитов NO у животных, получавших L-аргинин, относительно группы контроля (Рисунок 31).

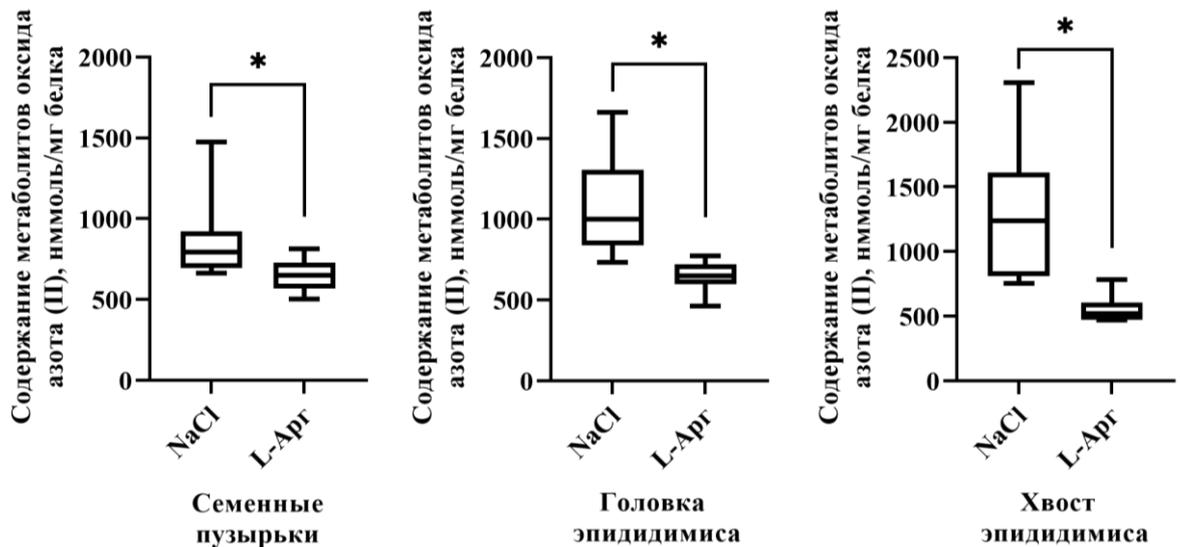


Рисунок 31 – Содержание NO<sub>x</sub> в митохондриях при назначении L-аргинина

Снижение концентрации метаболитов NO при назначении животным L-аргинина, возможно, связано с длительным воздействием оксида азота (II) на протяжении эксперимента, что стало причиной компенсаторного торможения экспрессии NOS.

При назначении L-аргинина животным, подвергавшимся гипоксическим тренировкам, отмечалось достоверное увеличение содержания метаболитов NO по сравнению с серией животных, получавших только L-аргинин (Рисунок 32).

Возможно, увеличение уровня метаболитов NO обусловлено торможением образования АФА в условиях кислорододефицита, что может иметь значение в развитии окислительного стресса.

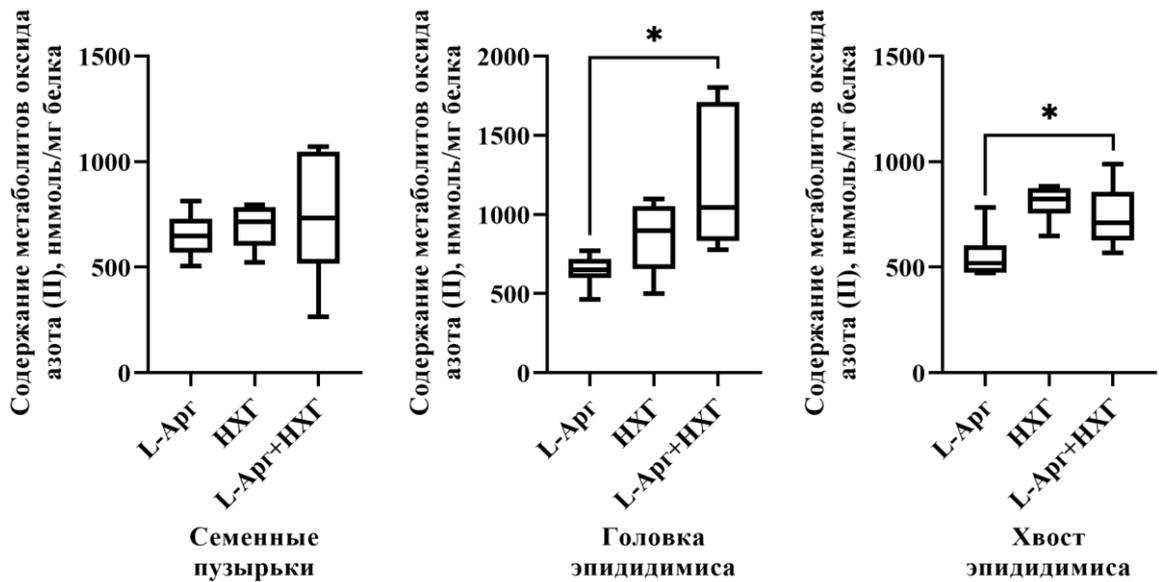


Рисунок 32 – Содержание  $\text{NO}_x$  в митохондриях при моделировании НХГ и при назначении L-аргинина

При назначении L-аргинина в качестве субстрата для синтеза NO отмечалось достоверное снижение активности ЦО во всех исследуемых тканях (Рисунок 33), в то время как активность АТФ-синтазы и СДГ не имела значимых отличий от группы контроля.

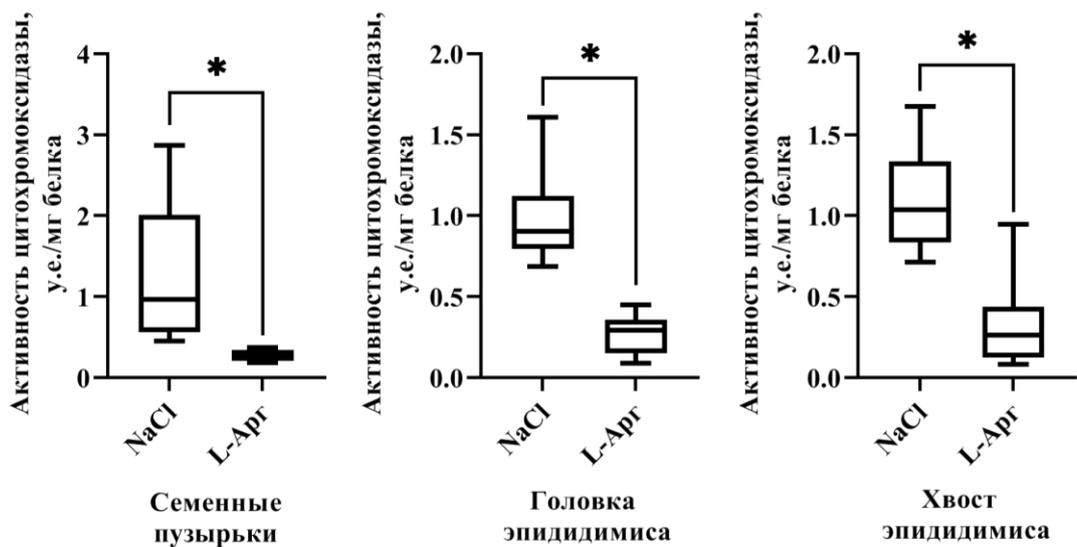


Рисунок 33 – Активность цитохромоксидазы при назначении L-аргинина

Уровень сукцината при этом статистически значимо снижался во всех исследуемых тканях (Рисунок 34).

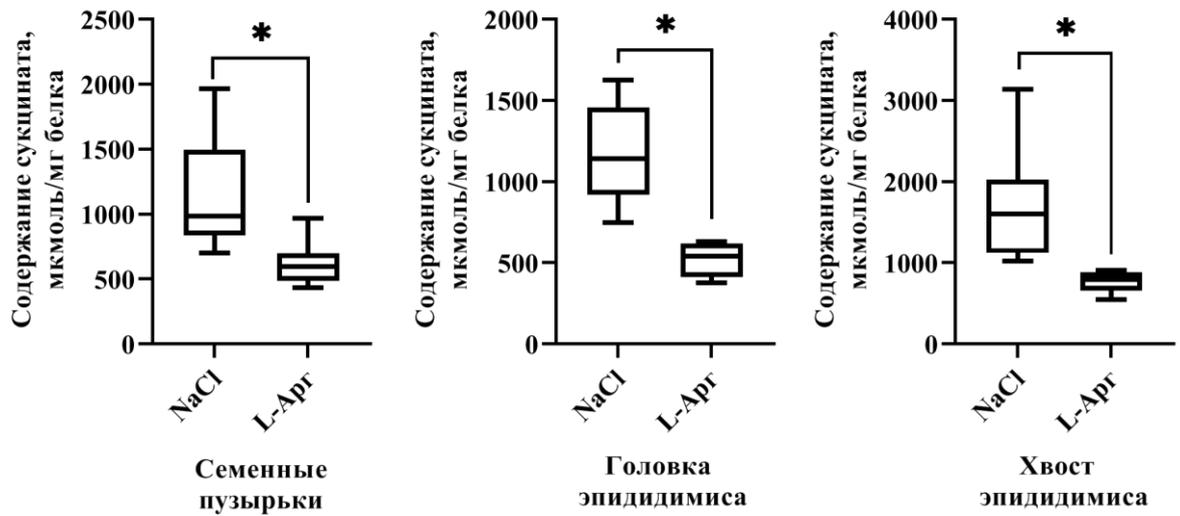


Рисунок 34 – Содержание сукцината в митохондриях при назначении L-аргинина

При сочетанном воздействии аргинина и гипоксии наблюдалось статистически значимое снижение активности ЦО в хвосте эпидидимиса относительно животных, подвергшихся только гипоксии (Рисунок 35). Но в головке эпидидимиса этот показатель оказался выше, чем у животных, получавших только аргинин.

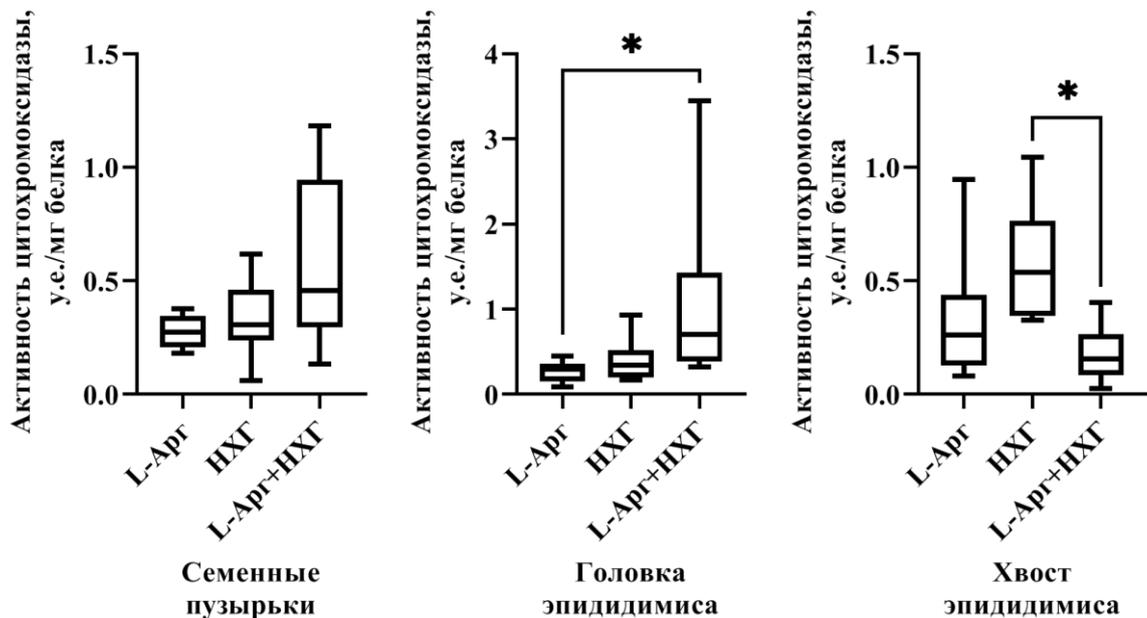


Рисунок 35 – Активность цитохромоксидазы при моделировании NHG и при назначении L-аргинина

Статистически значимые изменения активности СДГ при моделировании НХГ и назначении L-аргинина зафиксированы только для хвоста эпидидимиса: повышение относительно животных, получавших только аргинин (Рисунок 36).

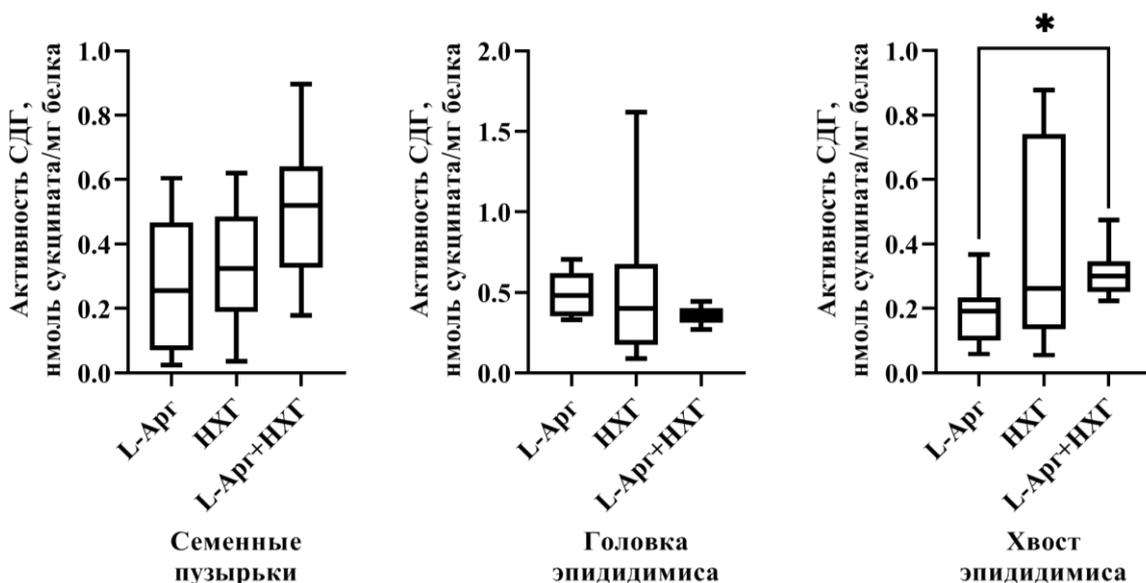


Рисунок 36 – Активность сукцинатдегидрогеназы при моделировании НХГ и при назначении L-аргинина

Содержание сукцината при сочетанном воздействии аргинина и гипоксии менялось только в митохондриях эпидидимиса. В головке эпидидимиса отмечалось повышение показателя относительно серий эксперимента L-Арг и НХГ, а в хвосте – только относительно серии L-Арг (Рисунок 37).

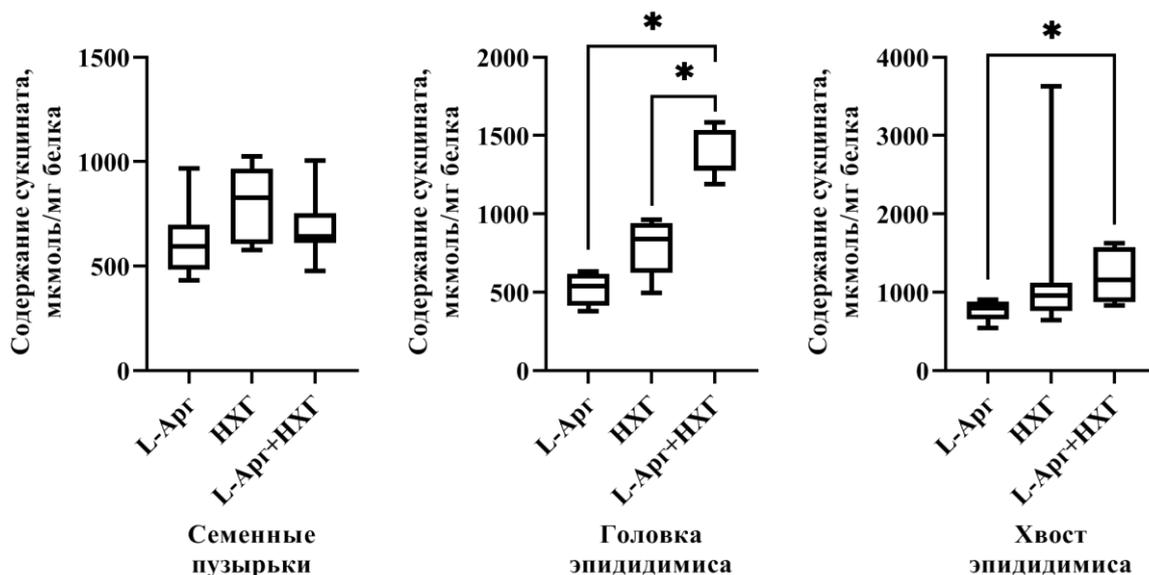


Рисунок 37 – Содержание сукцината в митохондриях при моделировании НХГ и при назначении L-аргинина

При сочетанном воздействии аргинина и НХГ наблюдалось достоверное снижение активности АТФ-синтазы в головке, но повышение в хвосте эпидидимиса (Рисунок 38).

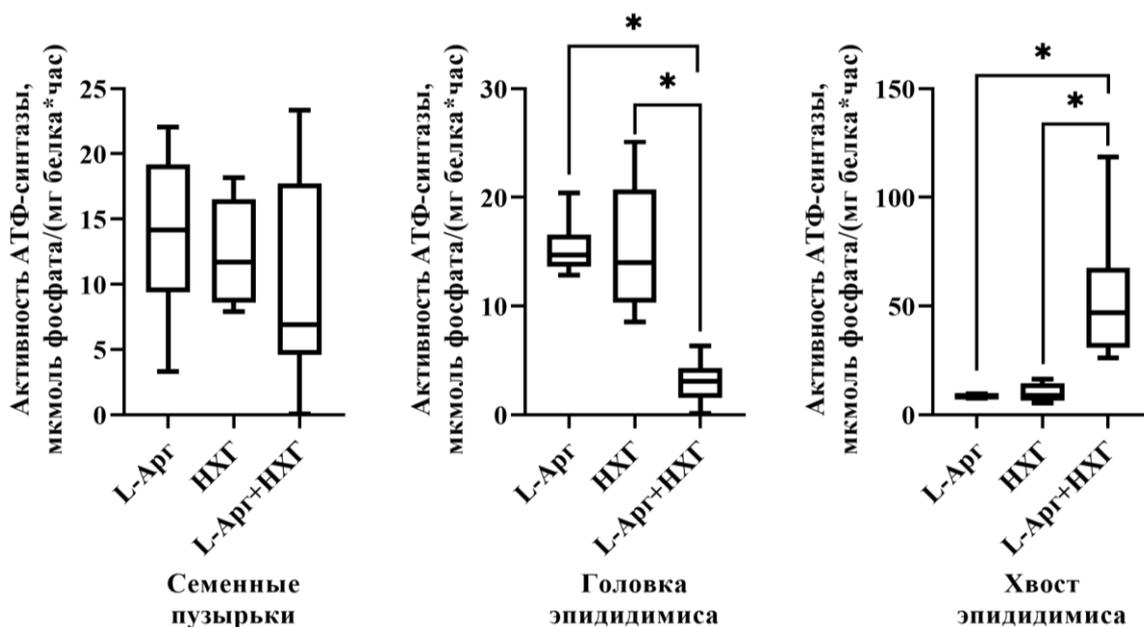


Рисунок 38 – Активности АТФ-синтазы при моделировании НХГ и при назначении L-аргинина

В условиях получения животными экзогенного L-аргинина отмечалось повышение ЛДГ1 МФ и понижение ЛДГх, как МФ, так и ЦФ (Таблица 11).

Таблица 11 – 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 и назначении L-аргинина

Группы	Митохондриальная фракция		Цитоплазматическая фракция	
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	Общая ЛДГ	ЛДГ1
<b>Семенные пузырьки</b>				
Группа 4: НХГ	1124 [1003; 1379]	2,92 [2,66; 3,23]	1272 [1224; 2550]	3,89 [3,73; 4,11]
Группа 5: NaCl	1140 [741; 2373]	2,78 [2,08; 3,7]	4071 [2823; 5028]	3,98 [3,86; 4,01]
Группа 8: L-Arg	565 [384; 783] p <sub>5-8</sub> =0,041*↓	3,05 [2,74; 3,35] p <sub>5-8</sub> =0,71	3542 [1909; 5909] p <sub>5-8</sub> =0,75	2,17 [1,79; 2,37] p <sub>5-8</sub> =0,0009*↓

Продолжение Таблицы 11

<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	625 [426; 1040] p <sub>4-9</sub> =0,19 p <sub>8-9</sub> =1	5,17 [4,65; 6,87] p <sub>4-9</sub> =0,004*↑ p <sub>8-9</sub> =0,0009*↑	3448 [2935; 3970] p <sub>4-9</sub> =0,014*↑ p <sub>8-9</sub> =0,96	2,16 [2; 2,2] p <sub>4-9</sub> =0,0009*↓ p <sub>8-9</sub> =0,71		
<b>Группы</b>	<b>Митохондриальная фракция</b>			<b>Цитоплазматическая фракция</b>		
	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>
<b>Головка эпидидимиса</b>						
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 5: NaCl</b>	1175 [720; 1838]	2,9 [2,29; 3,21]	17,49 [16,42; 23,67]	3765 [3295; 4511]	2,74 [2,33; 2,85]	16,69 [14,84; 20,86]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	1741 [1438; 2627] p <sub>5-8</sub> =0,27	5,18 [5,05; 5,2] p <sub>5-8</sub> = 0,013*↑	9,93 [7,29; 14,29] p <sub>5-8</sub> = 0,023*↓	4607 [4010; 5515] p <sub>5-8</sub> =0,23	2,44 [2,38; 2,53] p <sub>5-8</sub> =0,1	8,44 [7,94; 9,54] p <sub>5-8</sub> = 0,0009*↓
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	2466 [1328; 3284] p <sub>4-9</sub> = 0,004*↑ p <sub>8-9</sub> =0,71	3,25 [2,86; 3,68] p <sub>4-9</sub> = 0,014*↑ p <sub>8-9</sub> = 0,0009*↓	14,14 [13,07; 15,79] p <sub>4-9</sub> =0,71 p <sub>8-9</sub> =0,23	4088 [3247; 4775] p <sub>4-9</sub> =0,16 p <sub>8-9</sub> =0,27	3,46 [3,29; 3,68] p <sub>4-9</sub> = 0,0009*↑ p <sub>8-9</sub> = 0,0009*↑	8,77 [6,87; 10,85] p <sub>4-9</sub> = 0,004*↓ p <sub>8-9</sub> =0,71
<b>Хвост эпидидимиса</b>						
<b>Группы</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 5: NaCl</b>	1685 [902; 2556]	6,79 [6,59; 7]	15,3 [13,97; 15,89]	5289 [4088; 5845]	4,82 [4; 5,7]	10,03 [9,47; 11,31]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	3456 [2993; 3895] p <sub>5-8</sub> = 0,046*↑	3,33 [3,2; 3,52] p <sub>5-8</sub> = 0,014*↓	3,88 [3,6; 4,27] p <sub>5-8</sub> = 0,0009*↓	8375 [7407; 10510] p <sub>5-8</sub> = 0,005*↑	3,55 [3,18; 3,85] p <sub>5-8</sub> = 0,014*↓	13,18 [12,51; 13,92] p <sub>5-8</sub> = 0,014*↑
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	3475 [2331; 5748] p <sub>4-9</sub> =0,79 p <sub>8-9</sub> =0,79	3,9 [3,68; 4] p <sub>4-9</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-9</sub> =0,07	36,83 [35,42; 37,54] p <sub>4-9</sub> = 0,0009*↑ p <sub>8-9</sub> = 0,0009*↑	6507 [4536; 8196] p <sub>4-9</sub> =0,08 p <sub>8-9</sub> =0,16	4,05 [3,81; 4,64] p <sub>4-9</sub> =0,041 p <sub>8-9</sub> =0,041	15,19 [12,81; 17,07] p <sub>4-9</sub> = 0,041 p <sub>8-9</sub> =0,23

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группам 8; L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргина

На фоне НХГ аргинин способствовал повышению общей активности ЛДГ и ЛДГ1 в митохондриях, хотя значение ЛДГ1 оказалось ниже, чем в группе L-Арг. Но в цитоплазме доля ЛДГ1 статистически выше, чем в группах сравнения, также проявился эффект уменьшения ЛДГх относительно животных, подвергшихся только гипоксии.

Эффект аргинина, оказываемый на изменение количества молочной кислоты, сходен с эффектом гипоксии: увеличение в цитоплазме и уменьшение в митохондриях (Таблица 12). Однако моделирование условий кислорододефицита на фоне назначения L-аргинина привело к увеличению лактата в митохондриях.

Таблица 12 – Содержание лактата в митохондриальной и цитоплазматической фракциях семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и назначении L-аргинина, в мкмоль/мг белка

Группы	Митохондриальная фракция	Цитоплазматическая фракция
<b>Семенные пузырьки</b>		
Группа 4: НХГ	1,76 [1,41; 1,96]	1,66 [1,2; 1,99]
Группа 5: NaCl	4,76 [3,96; 7,76]	0,95 [0,61; 1,86]
Группа 8: L-Арг	2,59 [2,27; 2,99] p <sub>5-8</sub> =0,0007*↓	2,76 [1,6; 3,66] p <sub>5-8</sub> =0,03*↑
Группа 9: L-Арг+НХГ	4,8 [4,38; 5,69] p <sub>4-9</sub> =0,007*↑ p <sub>8-9</sub> =0,005*↑	2,49 [1,99; 3,07] p <sub>4-9</sub> =0,05 p <sub>8-9</sub> =0,56
<b>Головка эпидидимиса</b>		
Группа 4: НХГ	2,64 [2,23; 3,03]	1,94 [1,66; 2,2]
Группа 5: NaCl	4,47 [3,84; 5,92]	1,4 [0,96; 1,83]
Группа 8: L-Арг	2,72 [1,71; 5,36] p <sub>5-8</sub> =0,16	2,61 [2,41; 2,79] p <sub>5-8</sub> =0,0014*↑
Группа 9: L-Арг+НХГ	12,11 [10,86; 13,38] p <sub>4-9</sub> =0,0009*↑ p <sub>8-9</sub> =0,0028*↑	2,75 [2,42; 3,86] p <sub>4-9</sub> =0,031 p <sub>8-9</sub> =0,43
<b>Хвост эпидидимиса</b>		
Группа 4: НХГ	4,38 [2,75; 6,55]	1,6 [1,58; 1,65]
Группа 5: NaCl	6,76 [4,96; 8,77]	1,12 [0,77; 1,49]
Группа 8: L-Арг	3,07 [2,69; 5,1] p <sub>5-8</sub> =0,03*↓	3,95 [1,95; 4,63] p <sub>5-8</sub> =0,018*↑
Группа 9: L-Арг+НХГ	7,64 [5,42; 10,09] p <sub>4-9</sub> =0,16 p <sub>8-9</sub> =0,03	2,35 [1,85; 2,99] p <sub>4-9</sub> =0,014*↑ p <sub>8-9</sub> =0,43

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группам 8; L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргинина

Некоторые изменения, наблюдаемые в условиях получения экзогенного L-Арг, имеют сходную тенденцию с моделью НХГ. В частности, это прослеживается в накоплении молочной кислоты, HIF1 $\alpha$ , и в активности ЦО. Повышение количества HIF1 $\alpha$ , вызванное влиянием различных веществ даже в условиях нормального напряжения кислорода, характеризуют, как состояние псевдогипоксии. Транскрипционная активность HIF1 $\alpha$  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) [46].

Влияние L-аргинина на стабилизацию HIF1 $\alpha$  объясняет схожесть метаболического ответа в этой экспериментальной модели с ответом при НХГ. Однако при этом наблюдается тканеспецифичность реакции. Так, в семенных пузырьках L-Арг способствовал почти полному соответствию изменений, характерных для гипоксии (увеличение концентрации лактата, количества HIF1 $\alpha$  и активности ЛДГ в цитоплазме, снижение активности ЦО), при этом в эксперименте с экзогенным получением животными L-Арг на фоне НХГ накопление HIF1 $\alpha$  в цитоплазме происходило эффективнее, чем в условиях только гипоксии. Возможно, сочетанное влияние этих факторов произвело некоторый кумулятивный эффект, что и послужило причиной повышения активности ЛДГ в цитоплазме клеток семенных пузырьков относительно состояния гипоксии и накопления лактата относительно как НХГ, так и L-Арг в митохондриях. Предположительно в основе этих изменений лежит опосредованная HIF активация экспрессии ЛДГ [46].

Изменение активности фракций ЛДГ может свидетельствовать о положительном влиянии оксида азота на экспрессию ЛДГВ 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 LDHC оксидом азота (II) [42].

Наблюдаемое снижение содержания HIF1 $\alpha$  в митохондриальной фракции в условиях НХГ или при получении L-Арг можно связать с повышением его транскрипционной активности, вызванной систематическим воздействием этих факторов. Мы предполагаем, что за время эксперимента удалось добиться стабильного транскрипционного ответа, благодаря чему необходимость острого реагирования путём непосредственного связывания HIF1 $\alpha$  с белками внешней мембраны митохондрий становится менее значимой [46].

Отсутствие статистически значимых изменений в активности СДГ, но при этом истощение пула сукцината, как и накопление лактата, говорит о переключении работы ЭТЦ с основного поставщика протонов в условиях нормоксии комплекса I на работу комплекса II. Таким образом, клетка пытается компенсировать неэффективное в обсуждаемых условиях окисление кофермента НАДН, восстанавливая пируват в лактат, для поддержания работы гликолиза и цитратного цикла, а работа ЭТЦ поддерживается за счёт окисления в основном сукцината. При этом получение L-Арг не повлияло на активность АТФ-синтазы [46].

В эпидидимисе эффект назначения экзогенного L-Арг оказался схожим с таковым в семенных пузырьках. Отличительной чертой явилось накопление лактата в цитоплазме тканей и повышение активности ЛДГ в хвосте эпидидимиса. Ранее в наших исследованиях мы описывали различия между функциональными участками придатка яичка [64, 26] в том числе в накоплении лактата и HIF1 $\alpha$  в условиях НХГ [47]. Назначение экзогенного L-Арг демонстрирует противоположные эффекты: повышение активности ЛДГ в хвосте при отсутствии изменений в головке придатка яичка. Интересно, что у животных в группе НХГ+L-Арг наблюдалось повышение активности ЦО в головке эпидидимиса, но в хвосте отмечалось самое низкое значение активности фермента.

Повышение активности СДГ и накопление сукцината при этом могут свидетельствовать о перестройке работы ЭТЦ: в отсутствие эффективного транспорта электронов через цитохромоксидазу конечным акцептором может

являться фумарат, что и приводило к увеличению концентрации сукцината, тем самым усиливая его сигнальную функцию и снижая образование АФК. Можно сделать предположение о влиянии экзогенного аргинина при гипоксии на клетки хвоста эпидидимиса, как мощного стимула для сигналинга и переключения метаболизма на получение энергии путём гликолиза [46].

Курсовое назначение экзогенного L-Арг в дозе 500 мг/кг массы тела не привело к ожидаемому повышению NO в тканях на момент завершения эксперимента. Объяснить данный феномен можно, с одной стороны, гипоксия-подобным эффектом L-Арг, а с другой – активацией аргиназы с помощью нитрозилирования [93], что в совокупности способствовало снижению уровня метаболитов NO. Возможно, такой механизм лежит в основе адаптации тканей и защите их от избытка оксида азота (II) [46].

Парентеральное получение животными L-аргинина вызывает в клетках семенных пузырьков и хвоста эпидидимиса развитие псевдогипоксии, что частично усиливает эффекты, развивающиеся при хронической нормобарической гипоксии. В головке эпидидимиса эта закономерность выражена меньше.

Являясь предшественником оксида азота (II) L-аргинин способствует понижению активности цитохромоксидазы во всех тканях, увеличению роли гликолиза в эпидидимисе, о чём свидетельствует повышение активности лактатдегидрогеназы и накопление лактата, особенно в хвосте, где также наблюдается реверсия работы сукцинатдегидрогеназы, что обеспечивает клетку лучшей защитой в условиях хронической нормобарической гипоксии.

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

### 3.5. 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, 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 (Таблица 13).

Таблица 13 – Площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот в белках митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и назначении L-аргинина, в у.е./мг белка

Группы	САДНФГ нейт	САДНФГ осн	СКДНФГ нейт	СКДНФГ осн	Собщ
<b>Семенные пузырьки</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	16,48 [13,64; 18,14]	2,87 [2,68; 3,38]	4,24 [3,38; 4,48]	0,44 [0,39; 0,53]	24,76 [20,08; 26,08]
<b>Группа 5: NaCl</b>	8,15 [7,71; 9,55]	0,8 [0,75; 1,02]	2,38 [2,25; 2,55]	0,09 [0,08; 0,15]	11,42 [10,78; 13,45]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	15,13 [13,13; 16,3] p <sub>5-8</sub> = 0,0014*↑	2,95 [2,4; 3,44] p <sub>5-8</sub> = 0,0014*↑	3,65 [3,12; 4,23] p <sub>5-8</sub> =0,005*↑	0,52 [0,45; 0,59] p <sub>5-8</sub> =0,0019*↑	22,24 [19,09; 24,59] p <sub>5-8</sub> = 0,0009*↑
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	23,49 [12,68; 27,35] p <sub>4-9</sub> =0,32 p <sub>8-9</sub> =0,23	7,7 [2,67; 10,94] p <sub>4-9</sub> =0,19 p <sub>8-9</sub> =0,19	7,79 [3,11; 8,56] p <sub>4-9</sub> =0,27 p <sub>8-9</sub> =0,23	1,29 [0,45; 1,92] p <sub>4-9</sub> =0,16 p <sub>8-9</sub> =0,19	42,26 [18,9; 50,1] p <sub>4-9</sub> =0,32 p <sub>8-9</sub> =0,27
<b>Головка эпидидимиса</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	295,2 [228,97; 336,5]	8,77 [6,27; 10,62]	11,86 [7,36; 12,64]	1,46 [1,07; 1,85]	319,12 [241; 363,6]
<b>Группа 5: NaCl</b>	8,88 [7,88; 10,04]	0,86 [0,81; 1,23]	1,68 [1,46; 1,97]	0,152 [0,12; 0,19]	11,81 [10,14; 13,38]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	15,85 [12,67; 18,41] p <sub>5-8</sub> = 0,007*↑	3,04 [2,16; 3,77] p <sub>5-8</sub> = 0,0009*↑	3,98 [3,27; 4,59] p <sub>5-8</sub> = 0,0014*↑	0,39 [0,32; 0,49] p <sub>5-8</sub> =0,0019*↑	24,49 [17,62; 26,76] p <sub>5-8</sub> = 0,0019*↑
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	23,32 [19,3; 26,74] p <sub>4-9</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-9</sub> =0,03	5,95 [5,58; 7] p <sub>4-9</sub> =0,27 p <sub>8-9</sub> = 0,0009*↑	7,79 [7,22; 9,68] p <sub>4-9</sub> =0,43 p <sub>8-9</sub> =0,0009*↑	0,93 [0,87; 0,96] p <sub>4-9</sub> =0,073 p <sub>8-9</sub> =0,0014*↑	37,25 [34,91; 40,96] p <sub>4-9</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-9</sub> = 0,0019*↑

Хвост эпидидимиса					
<b>Группа 4: НХГ</b>	28,84 [24,19; 30]	5,16 [4,9; 6,09]	6,46 [6,09; 7,03]	0,849 [0,71; 0,9]	41,28 [36,4; 43,57]
<b>Группа 5: NaCl</b>	5,35 [3,49; 6,01]	2,11 [1,81; 2,19]	2,54 [2,49; 2,7]	0,31 [0,3; 0,36]	10,37 [7,94; 11,18]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	10,15 [9,49; 10,91] $p_{5-8}=0,003^*\uparrow$	1,48 [1,3; 1,64] $p_{5-8}=0,083$	2,17 [1,82; 2,43] $p_{5-8}=0,083$	0,21 [0,17; 0,25] $p_{5-8}=0,052$	14,24 [13,3; 14,76] $p_{5-8}=0,03^*\uparrow$
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	19,63 [14,32; 20,71] $p_{4-9}=0,0054^*\downarrow$ $p_{8-9}=0,014^*\uparrow$	4,6 [3,42; 5,16] $p_{4-9}=0,01$ $p_{8-9}=0,01^*\uparrow$	4,96 [3,75; 5,76] $p_{4-9}=0,014^*\downarrow$ $p_{8-9}=0,014^*\uparrow$	0,73 [0,54; 0,86] $p_{4-9}=0,27$ $p_{8-9}=0,003^*\uparrow$	30,22 [22,03; 32,75] $p_{4-9}=0,0054^*\downarrow$ $p_{8-9}=0,014^*\uparrow$

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группам 8; L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргинина

При назначении L-аргинина на фоне НХГ заметно, что действие препарата снижает продукцию карбонильных производных белков в тканях эпидидимиса, но не вызывает достоверных изменений в семенных пузырьках (Таблица 13).

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% ( $p=0,0009$ ) (Рисунок 39).

При сочетанном воздействии гипоксии и L-аргинина в семенных пузырьках отмечалось снижение РАП относительно серии НХГ, а в хвосте эпидидимиса – относительно серии L-Арг (Рисунок 39).

Активность СОД в митохондриях семенных пузырьков и головки эпидидимиса достоверно снижалась в эксперименте с получением животными L-аргинина (Рисунок 40). При сочетанном воздействии L-аргинина и гипоксии активность СОД возрастает во всех исследуемых тканях, но в хвосте придатка яичка эти изменения не являлись достоверными (Рисунок 40).

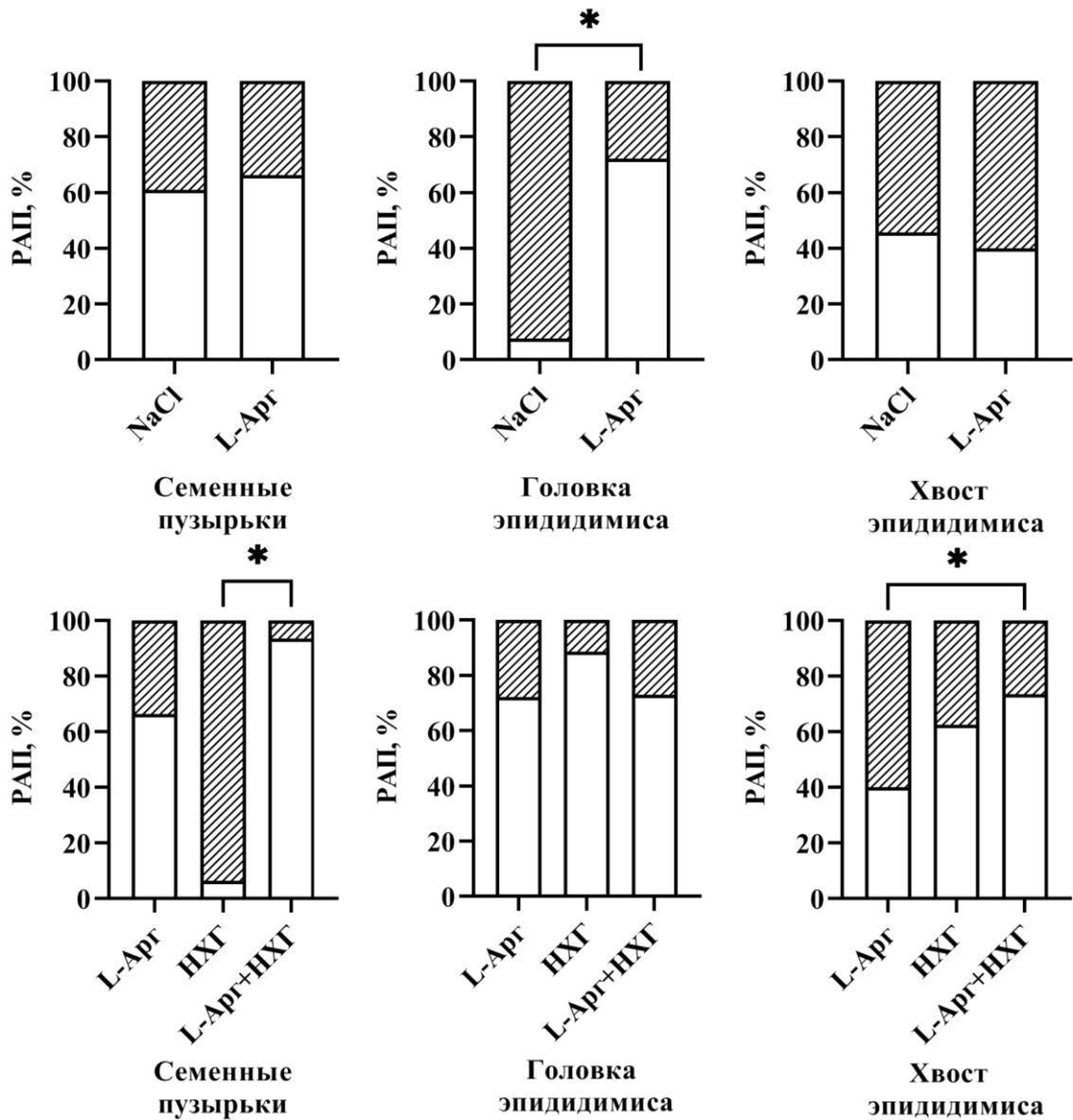


Рисунок 39 – Сравнение изменения резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий (РАП) при моделировании НХГ и назначении L-аргина

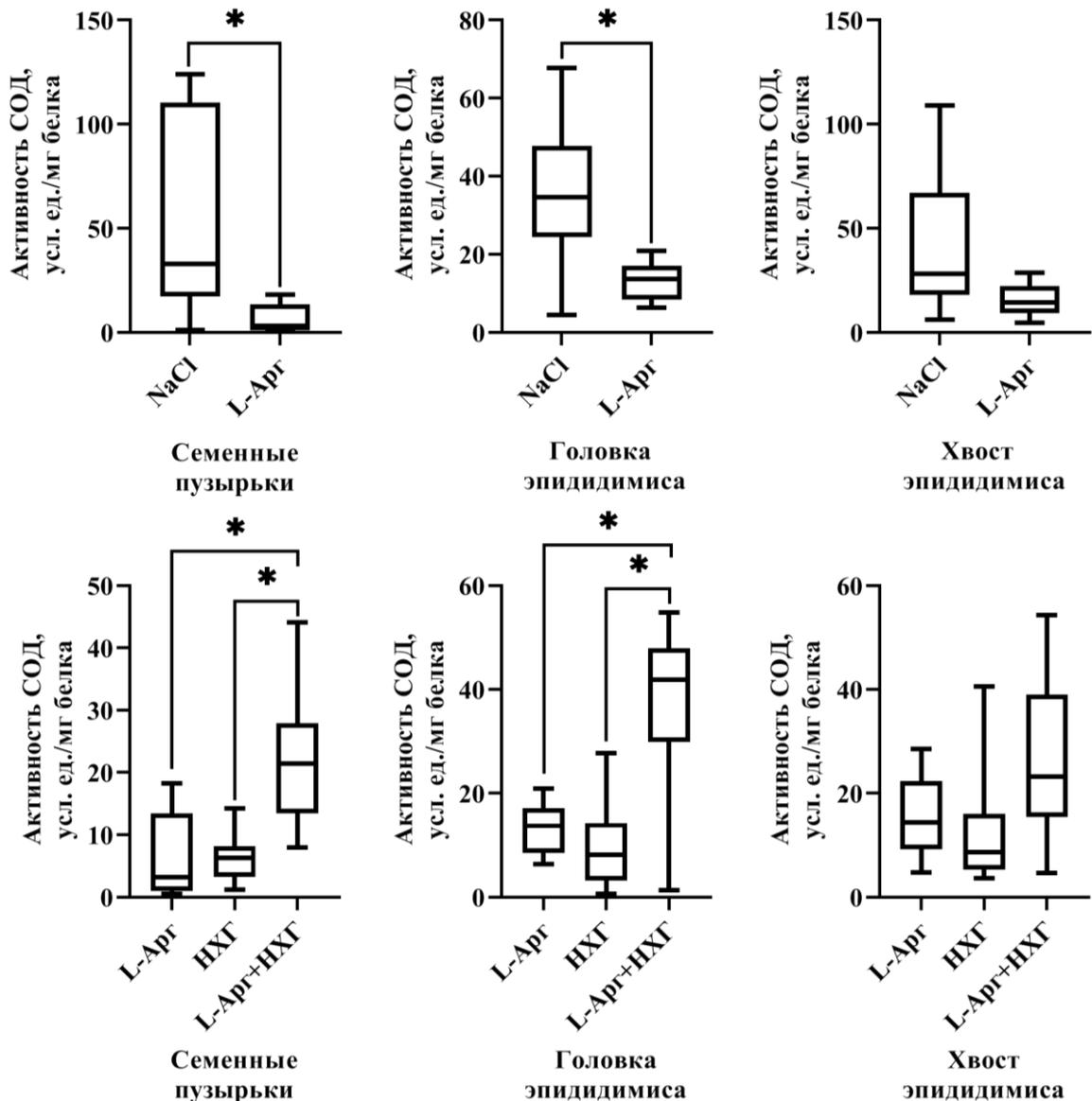


Рисунок 40 – Активность супероксиддисмутазы при моделировании НХГ и назначении L-аргинина

Действие L-аргинина на окислительную модификацию белков сходно с влиянием L-NAME и НХГ, что может быть обусловлено пониженным содержанием оксида азота (II), наблюдающимся в этих экспериментальных условиях (Рисунок 15, 28). Заметно, что в семенных пузырьках карбонилирование белков при гипоксии и в присутствии L-аргинина более выражено, чем при экспериментальном дефиците NO (II) (Таблица 9, 13), что может служить подтверждением наличия кумулятивного эффекта. Однако, в отличие от L-NAME-опосредованного дефицита NO, карбонильный стресс, вызванный L-аргонином, не сопровождается изменением РАП в относительно

устойчивых к гипоксии семенных пузырьках и хвосте эпидидимиса, что указывает на иной механизм карбонилирования белков.

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. 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.

### **3.6. ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И В УСЛОВИЯХ НАЗНАЧЕНИЯ СУКЦИНАТА**

#### **3.6.1. Изменение биохимических показателей при назначении сукцината**

Из анализа литературных данных известно, что содержание сукцината после внутривенного введения в митохондриях печени, миокарда и коры головного мозга повышается незначительно [76]. В нашем исследовании в условиях получения экзогенного сукцината в митохондриях семенных пузырьков отмечалось снижение содержания янтарной кислоты относительно группы контроля (Рисунок 41).

Полученные результаты можно объяснить высоким содержанием транспортных систем, способных переносить сукцинат в клетку, и низкой скоростью экспрессии митохондриальных переносчиков сукцината в эпидидимисе по сравнению с семенными пузырьками [91], что является ключом к пониманию эффектов янтарной кислоты, оказываемых как на уровне паракринного мессенджера, так и на уровне аллостерического регулятора (в случае проникновения в клетку).

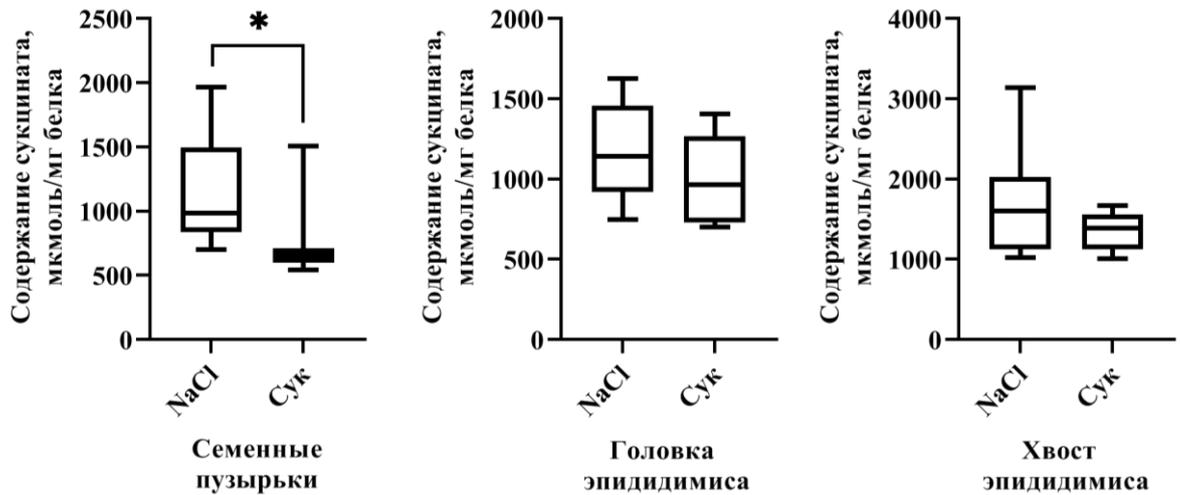


Рисунок 41 – Содержание сукцината в митохондриях при назначении сукцината

Кроме того, на транспорт сукцината может оказывать влияние лактат и другие кислые компоненты, например, угольной кислоты, образующейся при вдыхании газовой смеси, содержащей высокий процент  $\text{CO}_2$ : в условиях закисления среды затрудняется диссоциация сразу двух карбоксильных групп сукцината, что делает его монокарбоксилатом и даёт возможность использовать МСТ для перехода между компартментами клетки [87, 121, 178].

В условиях назначения сукцината при НХГ отмечалось снижение его содержания в митохондриях семенных пузырьков и хвоста эпидидимиса (Рисунок 42).

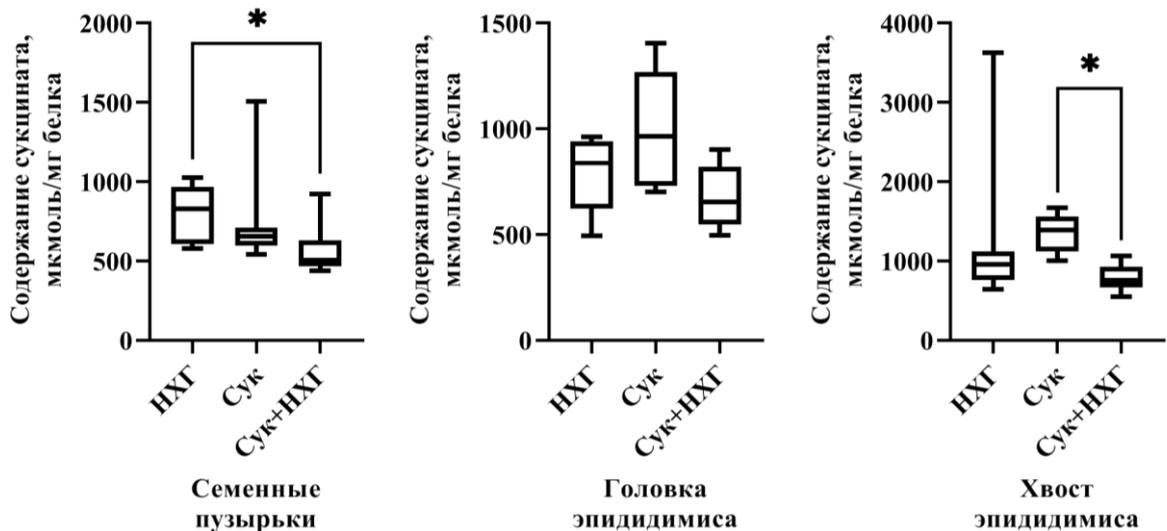


Рисунок 42 – Содержание сукцината в митохондриях при моделировании НХГ и назначении сукцината

Курсовое (в течение 14 дней) назначение сукцината спровоцировало снижение количества HIF1 $\alpha$  в митохондриях, но не в цитоплазме семенных пузырьков без статистически значимого изменения соотношения этих фракций (Таблица 14). В придатке яичка наблюдалось повышение HIF1 $\alpha$  ЦФ, при этом в хвосте эпидидимиса соотношение МФ / ЦФ снижалось по сравнению с контролем. Назначение сукцината при гипоксии не привело к изменению содержания этого белка относительно экспериментальной НХГ, а только способствовало изменению соотношения МФ / ЦФ в семенных пузырьках в сторону увеличения ЦФ. В семенных пузырьках в МФ и в хвосте придатка яичка в обеих фракциях HIF1 $\alpha$  оказался ниже, чем при назначении сукцината.

Таблица 14 – Количество HIF1 $\alpha$  в митохондриальной и цитоплазматической фракциях при моделировании НХГ и назначении сукцината, в нг/мг белка

Группы	HIF1 $\alpha$ МФ	HIF1 $\alpha$ ЦФ	Соотношение HIF1 $\alpha$ МФ / ЦФ
<b>Семенные пузырьки</b>			
Группа 4: НХГ	14,84 [11,57; 19,94]	2,99 [2,88; 4,29]	4,66 [3,38; 5,7]
Группа 5: NaCl	23,58 [20,36; 30,43]	3,13 [2,94; 4,5]	7,03 [4,48; 10,64]
Группа 10: Сук	16,32 [13,83; 17,85] p <sub>5-10</sub> =0,031*↓	3,73 [3,03; 5,3] p <sub>5-10</sub> =0,56	5,06 [3,33; 5,77] p <sub>5-10</sub> =0,16
Группа 11: Сук+НХГ	8,64 [7,14; 11,75] p <sub>4-11</sub> =0,041 p <sub>10-11</sub> =0,0054*↓	4,34 [3,23; 5,51] p <sub>4-11</sub> =0,104 p <sub>10-11</sub> =0,637	2,01 [1,55; 2,73] p <sub>4-11</sub> =0,0054*↓ p <sub>10-11</sub> =0,018
<b>Головка эпидидимиса</b>			
Группа 4: НХГ	12,23 [10,02; 16,82]	3,88 [2,8; 4,13]	3,73 [3,37; 3,99]
Группа 5: NaCl	12,36 [10,58; 15,5]	3,2 [2,37; 3,27]	4,18 [3,7; 5,32]
Группа 10: Сук	11,55 [10,16; 16,17] p <sub>5-10</sub> =0,87	3,98 [3,49; 4,26] p <sub>5-10</sub> =0,014*↑	3,19 [2,39; 4,34] p <sub>5-10</sub> =0,16
Группа 11: Сук+НХГ	9,05 [8,45; 10,23] p <sub>4-11</sub> =0,024 p <sub>10-11</sub> =0,04	3,27 [2,56; 3,85] p <sub>4-11</sub> =0,37 p <sub>10-11</sub> =0,16	2,95 [2,39; 3,11] p <sub>4-11</sub> =0,04 p <sub>10-11</sub> =0,71

Хвост эпидидимиса			
Группа 4: НХГ	12,83 [11,11; 13,65]	4,3 [3,91; 4,62]	2,86 [2,42; 3,37]
Группа 5: NaCl	21,3 [16,99; 24,29]	3,08 [2,66; 3,91]	6,96 [4,97; 9,72]
Группа 10: Сук	19,6 [16,47; 20,26]	7,02 [6,41; 7,88]	2,81 [2,11; 3,17]
	$p_{5-10}=0,37$	$p_{5-10}=0,0009*\uparrow$	$p_{5-10}=0,0009*\downarrow$
Группа 11: Сук+НХГ	9,8 [8,27; 13,26]	3,87 [3,52; 4,1]	2,57 [2,35; 3,48]
	$p_{4-11}=0,13$	$p_{4-11}=0,1$	$p_{4-11}=0,37$
	$p_{10-11}=0,0009*\downarrow$	$p_{10-11}=0,0009*\downarrow$	$p_{10-11}=0,56$

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группе 10; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты; МФ – митохондриальная фракция; ЦФ – цитоплазматическая фракция

В митохондриях эпидидимиса, наблюдаемое достоверное снижение концентрации метаболитов оксида азота (II) у животных, получавших сукцинат, относительно группы контроля (Рисунок 43) может быть обусловлено эффектами HIF1 [180].

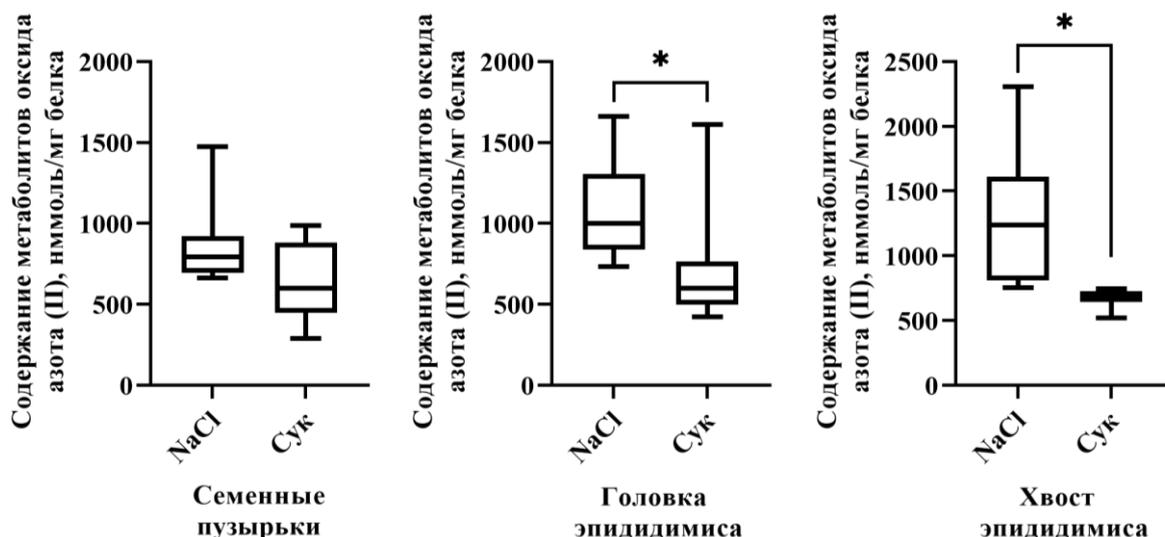


Рисунок 43 – Содержание NO<sub>x</sub> в митохондриях при назначении сукцината

Назначение сукцината привело к статистически значимому снижению активности ЦО в митохондриях эпидидимиса (Рисунок 44), но не повлияло на активность СДГ и АТФ-синтазы.

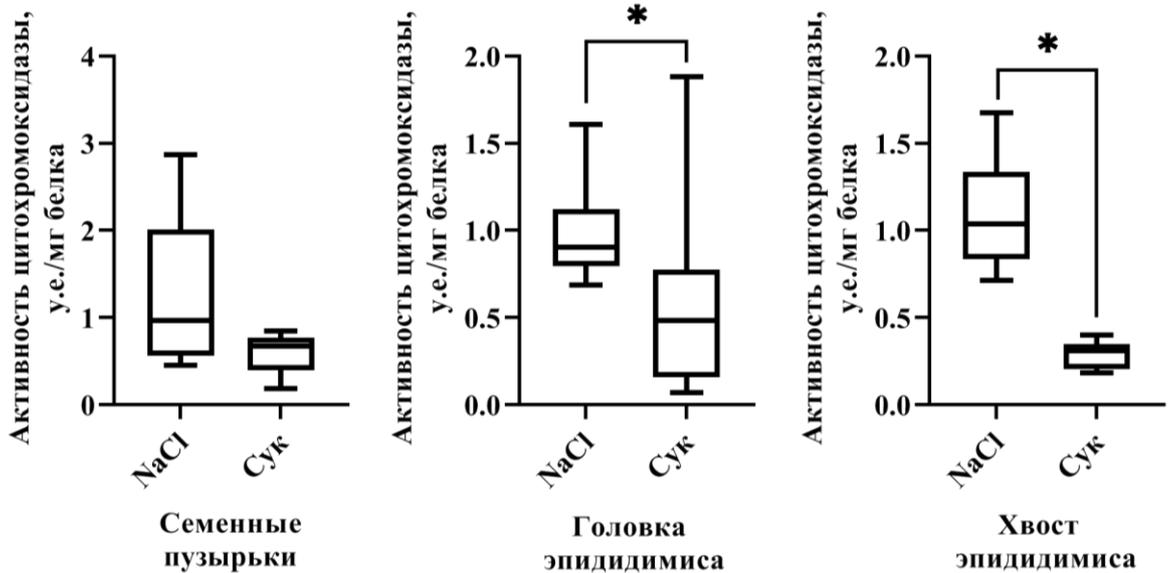


Рисунок 44 – Активность цитохромоксидазы при назначении сукцината

В полученных результатах чётко прослеживалась тканеспецифичность метаболических изменений в ответ на экзогенное введение сукцината. В сочетании с литературными данными о транспорте этого метаболита, можно сделать предположение о возможности эпидидимиса более эффективно поглощать сукцинат из крови, но не перемещать его внутрь митохондрий, в то время как семенные пузырьки уступают по скорости захвата экзогенного сукцината, но имеют склонность быстро высвобождать его из митохондрий в цитоплазму. К тому же снижение активности ЦО могло послужить причиной перераспределения потока электронов через ЭТЦ, что усилило роль фумарата, как конечного акцептора электронов, и способствовало поддержанию концентрации сукцината в митохондриях эпидидимиса на уровне контрольной группы.

При моделировании НХГ и назначении сукцината достоверных отличий в количестве метаболитов оксида азота и активности ЦО в экспериментальных сериях выявлено не было. При этом отмечалось повышение активности СДГ в хвосте эпидидимиса (Рисунок 45). Известно, что в семенных пузырьках преобладает изоформа SCS, использующая сукцинат для получения сукцинил-КоА с последующей активацией синтеза гема [91], что может послужить

объяснением повышения гемсодержащих белков и сохранения их активности в условиях гипоксии.

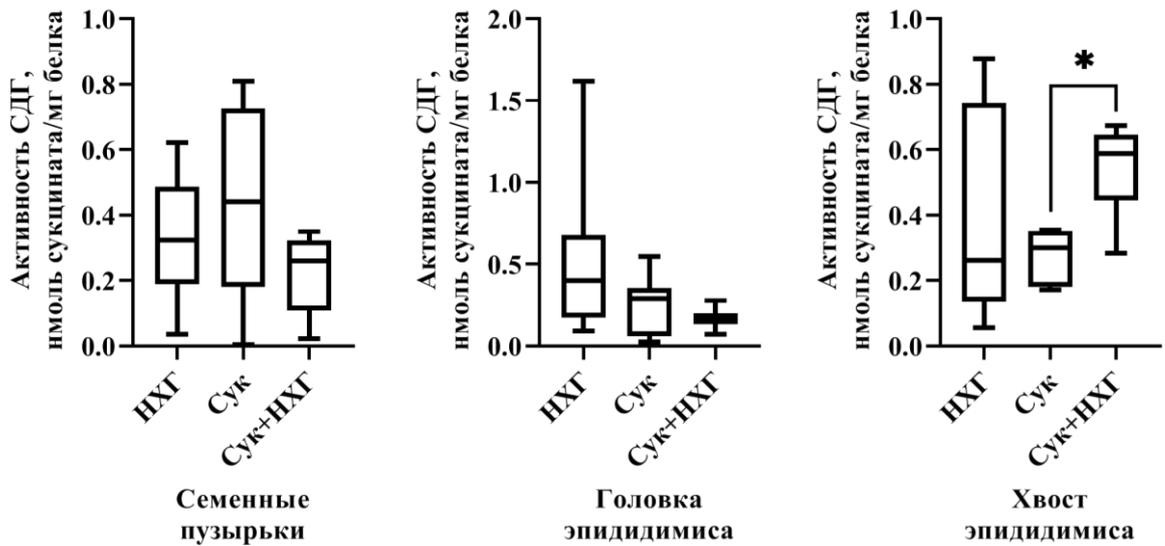


Рисунок 45 – Активность сукцинатдегидрогеназы при моделировании NHG и назначении сукцината

В то же время в митохондриях головки эпидидимиса активность АТФ-синтазы оказалась ниже, чем у животных, подвергшихся только гипоксии (Рисунок 46).

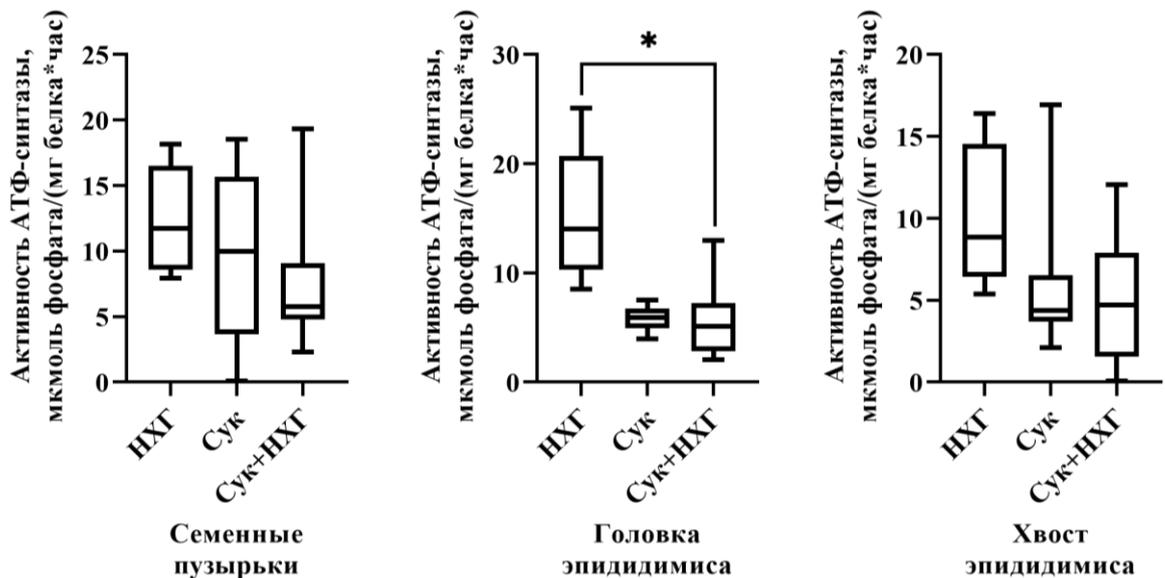


Рисунок 46 – Активность АТФ-синтазы при моделировании NHG и назначении сукцината

Исходя из анализа литературных данных, при назначении сукцината следует ожидать увеличение роли гликолиза [256, 257]. В нашем исследовании

общая активность ЛДГ повысилась только в митохондриях головки эпидидимиса, а активность ЦФ ЛДГ в семенных пузырьках оказалась ниже, чем в контрольной группе (Таблица 15), что, на первый взгляд, не согласуется с теоретическими выводами об эффектах воздействия сукцината на энергетический обмен клетки. Однако оценка вклада каждой фракции фермента в общую активность показала, что доля ЛДГ1 статистически значимо снижалась как в семенных пузырьках, так и в эпидидимисе. Отмечалось снижение специфической для сперматозоидов формы ЛДГх в МФ и ЦФ проксимального отдела придатка яичка, но повышение в дистальном. Поскольку и ЛДГ1 и ЛДГх имеют высокое сродство к лактату, который является значимым источником энергии для мужских половых клеток, то возникает предположение, что снижение этих изоферментов при получении животными сукцината является следствием уменьшения потребности клеток в энергии, так как сукцинат подключается к окислительному фосфорилированию.

Таблица 15 – 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 и назначении сукцината

Группы	Митохондриальная фракция		Цитоплазматическая фракция			
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	
<b>Семенные пузырьки</b>						
<b>Группа 4: НХГ</b>	1124 [1003; 1379]	2,92 [2,66; 3,23]	1272 [1224; 2550]	3,89 [3,73; 4,11]		
<b>Группа 5: NaCl</b>	1140 [741; 2373]	2,78 [2,08; 3,7]	4071 [2823; 5028]	3,98 [3,86; 4,01]		
<b>Группа 10: Сук</b>	803 [634; 960] p <sub>5-10</sub> =0,27	1,46 [1,23; 1,83] p <sub>5-10</sub> =0,014*↓	1202 [824; 1658] p <sub>5-10</sub> =0,0003*↓	2,89 [2,79; 3] p <sub>5-10</sub> =0,0009*↓		
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	615 [404; 1271] p <sub>4-11</sub> =0,19 p <sub>10-11</sub> =0,79	3,74 [2,91; 4,6] p <sub>4-11</sub> =0,23 p <sub>10-11</sub> =0,0039*↑	1506 [1280; 1834] p <sub>4-11</sub> =0,96 p <sub>10-11</sub> =0,31	3,54 [3,27; 3,85] p <sub>4-11</sub> =0,1 p <sub>10-11</sub> =0,004*↑		
Группы	Митохондриальная фракция			Цитоплазматическая фракция		
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх

Головка эпидидимиса						
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 5: NaCl</b>	1175 [720; 1838]	2,9 [2,29; 3,21]	17,49 [16,42; 23,67]	3765 [3295; 4511]	2,74 [2,33; 2,85]	16,69 [14,84; 20,86]
<b>Группа 10: Сук</b>	3177 [2870; 5200] $p_{5-10}=0,0024^*\uparrow$	2,25 [2,22; 2,4] $p_{5-10}=0,23$	12,47 [12,18; 12,53] $p_{5-10}=0,0009^*\downarrow$	5096 [4303; 6127] $p_{5-10}=0,16$	1,09 [0,87; 1,3] $p_{5-10}=0,004^*\downarrow$	6,02 [5,24; 6,81] $p_{5-10}=0,0009^*\downarrow$
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	2197 [971; 3835] $p_{4-11}=0,038$ $p_{10-11}=0,12$	2,3 [2,07; 2,82] $p_{4-11}=0,43$ $p_{10-11}=0,71$	13,68 [12,26; 14,85] $p_{4-11}=0,71$ $p_{10-11}=0,1$	4784 [3891; 7231] $p_{4-11}=0,26$ $p_{10-11}=0,036$	2,11 [1,92; 2,24] $p_{4-11}=0,1$ $p_{10-11}=0,004^*\uparrow$	6,68 [5,95; 8,05] $p_{4-11}=0,0009^*\downarrow$ $p_{10-11}=0,23$
Хвост эпидидимиса						
Группы	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 5: NaCl</b>	1685 [902; 2556]	6,79 [6,59; 7]	15,3 [13,97; 15,89]	5289 [4088; 5845]	4,82 [4; 5,7]	10,03 [9,47; 11,31]
<b>Группа 10: Сук</b>	3287 [1697; 4253] $p_{5-10}=0,16$	2,82 [2,81; 2,95] $p_{5-10}=0,014^*\downarrow$	21,33 [20,35; 23,44] $p_{5-10}=0,0019^*\uparrow$	3987 [2092; 8532] $p_{5-10}=0,96$	6,85 [4,63; 9,8] $p_{5-10}=0,23$	13,46 [11,8; 15,54] $p_{5-10}=0,014^*\uparrow$
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	2618 [1516; 3530] $p_{4-11}=0,32$ $p_{10-11}=0,6$	5,24 [4,85; 5,68] $p_{4-11}=0,71$ $p_{10-11}=0,0009^*\uparrow$	32,68 [30,26; 35,12] $p_{4-11}=0,04$ $p_{10-11}=0,004^*\uparrow$	6108 [5153; 6477] $p_{4-11}=0,0089^*\uparrow$ $p_{10-11}=0,32$	2,57 [2,29; 3,16] $p_{4-11}=0,0009^*\downarrow$ $p_{10-11}=0,0004^*\downarrow$	10,46 [8,86; 12,32] $p_{4-11}=0,71$ $p_{10-11}=0,041$

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группе 10; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

В гипоксических условиях получение животными экзогенного сукцината спровоцировало повышение общей активности ЛДГ ЦФ только в хвосте придатка яичка, где при этом снизилась доля ЛДГ1. В семенных пузырьках содержание фракции ЛДГ1 возросло как в цитоплазме, так и в митохондриях

при сохранении общей активности фермента, а в головке эпидидимиса – только в цитоплазме.

Содержание молочной кислоты при получении животными экзогенного сукцината увеличивалось только в цитоплазматической фракции клеток хвоста эпидидимиса (Таблица 16). В условиях моделирования гипоксии на фоне получения сукцината количество лактата увеличивается в ЦФ семенных пузырьков относительно обеих групп контроля, а в ЦФ хвоста придатка яичка снижается относительно группы, получавшей только сукцинат. В проксимальном отделе придатка яичка достоверных изменений не выявлено.

Таблица 16 – Содержание лактата в митохондриальной и цитоплазматической фракциях семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и назначении сукцината, в мкмоль/мг белка

Группы	Митохондриальная фракция	Цитоплазматическая фракция
<b>Семенные пузырьки</b>		
<b>Группа 4: НХГ</b>	1,76 [1,41; 1,96]	1,66 [1,2; 1,99]
<b>Группа 5: NaCl</b>	4,76 [3,96; 7,76]	0,95 [0,61; 1,86]
<b>Группа 10: Сук</b>	2,49 [1,58; 5,88] $p_{5-10}=0,08$	2,03 [1,41; 2,78] $p_{5-10}=0,2$
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	1,48 [1,07; 3,28] $p_{4-11}=0,87$ $p_{10-11}=0,19$	3,29 [2,86; 4,05] $p_{4-11}=0,00016^*\uparrow$ $p_{10-11}=0,01^*\uparrow$
<b>Хвост эпидидимиса</b>		
<b>Группа 4: НХГ</b>	4,38 [2,75; 6,55] $p_{3-4}=0,48$	1,6 [1,58; 1,65] $p_{3-4}=0,16$
<b>Группа 5: NaCl</b>	6,76 [4,96; 8,77]	1,12 [0,77; 1,49]
<b>Группа 10: Сук</b>	6,83 [5,97; 10,88] $p_{5-10}=0,23$	3,86 [3,09; 4,33] $p_{5-10}=0,000086^*\uparrow$
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	7,69 [2,34; 10,34] $p_{4-11}=0,53$ $p_{10-11}=0,27$	1,16 [0,23; 2,16] $p_{4-11}=0,34$ $p_{10-11}=0,0005^*\downarrow$

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группе 10; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

Возможно, в перераспределении лактата принимает участие транспортёр дикарбоксилатов, имеющий высокое сродство к сукцинату и низкое к лактату. Тогда получение сукцината животными в эксперименте могло повлиять на экспрессию белка-транспортёра, что и привело к усилению потока лактата из цитоплазмы в матрикс митохондрий.

Увеличение доли ЛДГ1 в митохондриях также указывает на повышение скорости утилизации лактата. По-видимому, это имеет приспособительное значение, и лактат, таким образом, эффективнее вовлекается в энергетический обмен в условиях дефицита кислорода и последующей реоксигенации, обеспечивая поддержание баланса НАДН/НАД<sup>+</sup> и препятствуя развитию ацидоза [45].

### **3.6.2. Изменение биохимических показателей при назначении сукцината и при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II)**

При сочетанном применении сукцината и L-NAME достоверное снижение концентрации метаболитов NO наблюдалось только в митохондриях хвоста эпидидимиса (Рисунок 47). Эксперимент, в котором исследовались три фактора: введение сукцината, L-NAME и моделирование НХГ, показал достоверное снижение количества метаболитов NO в эпидидимисе относительно животных, подвергшихся только влиянию гипоксии, кроме того, в хвосте эпидидимиса этот показатель оказался ниже, чем у животных, получавших только сукцинат (Рисунок 47).

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 в митохондриях семенных пузырьков относительно животных, получавших только L-NAME, но достоверное снижение этого показателя в хвосте эпидидимиса, причём относительно обеих сравниваемых групп (Рисунок 48).

Исследование митохондрий экспериментальной группы Сук+L-NAME+НХГ показало статистически значимое увеличение активности СДГ только в семенных пузырьках относительно группы L-NAME (Рисунок 48).

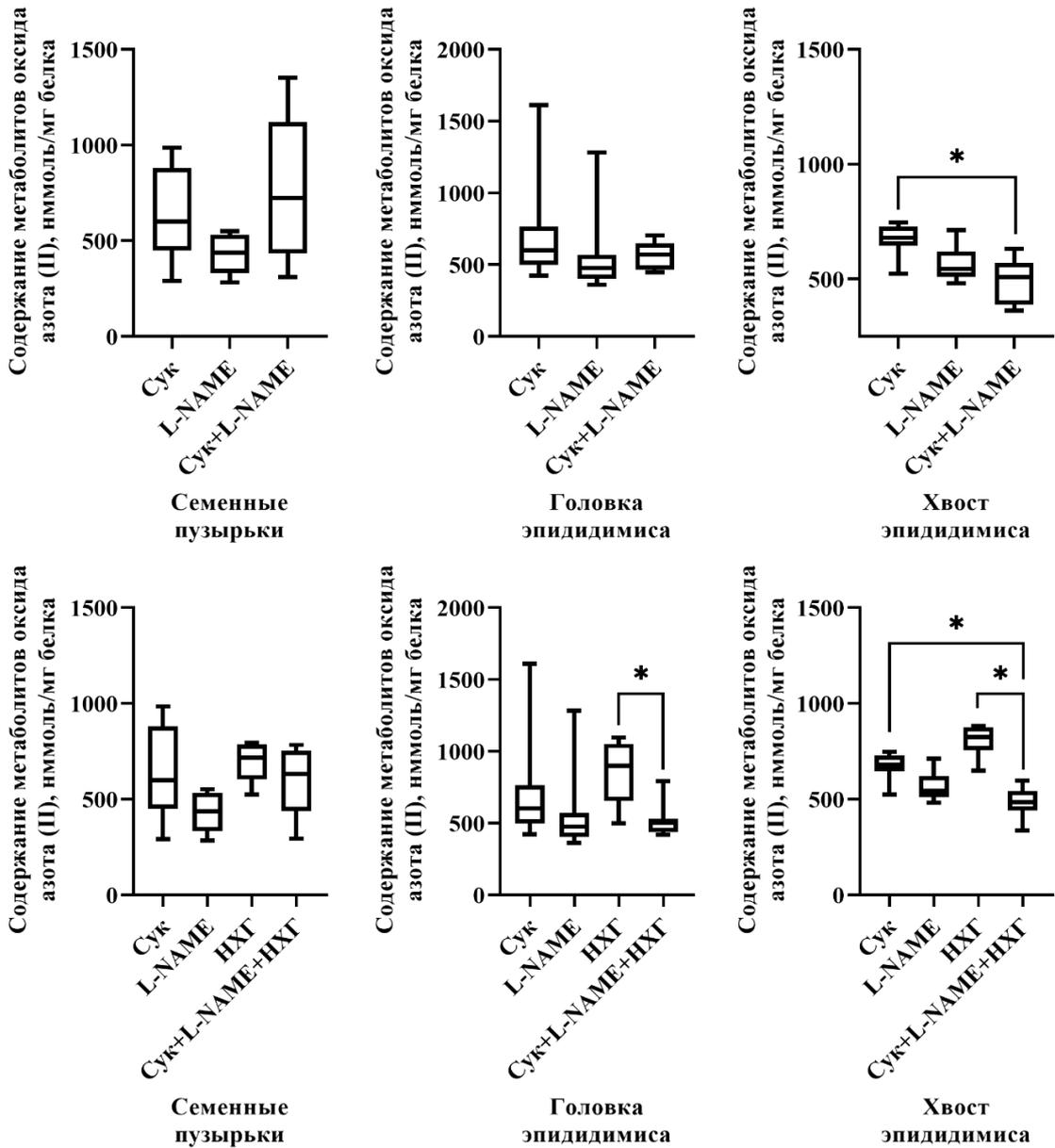


Рисунок 47 – Содержание  $\text{NO}_x$  в митохондриях при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината

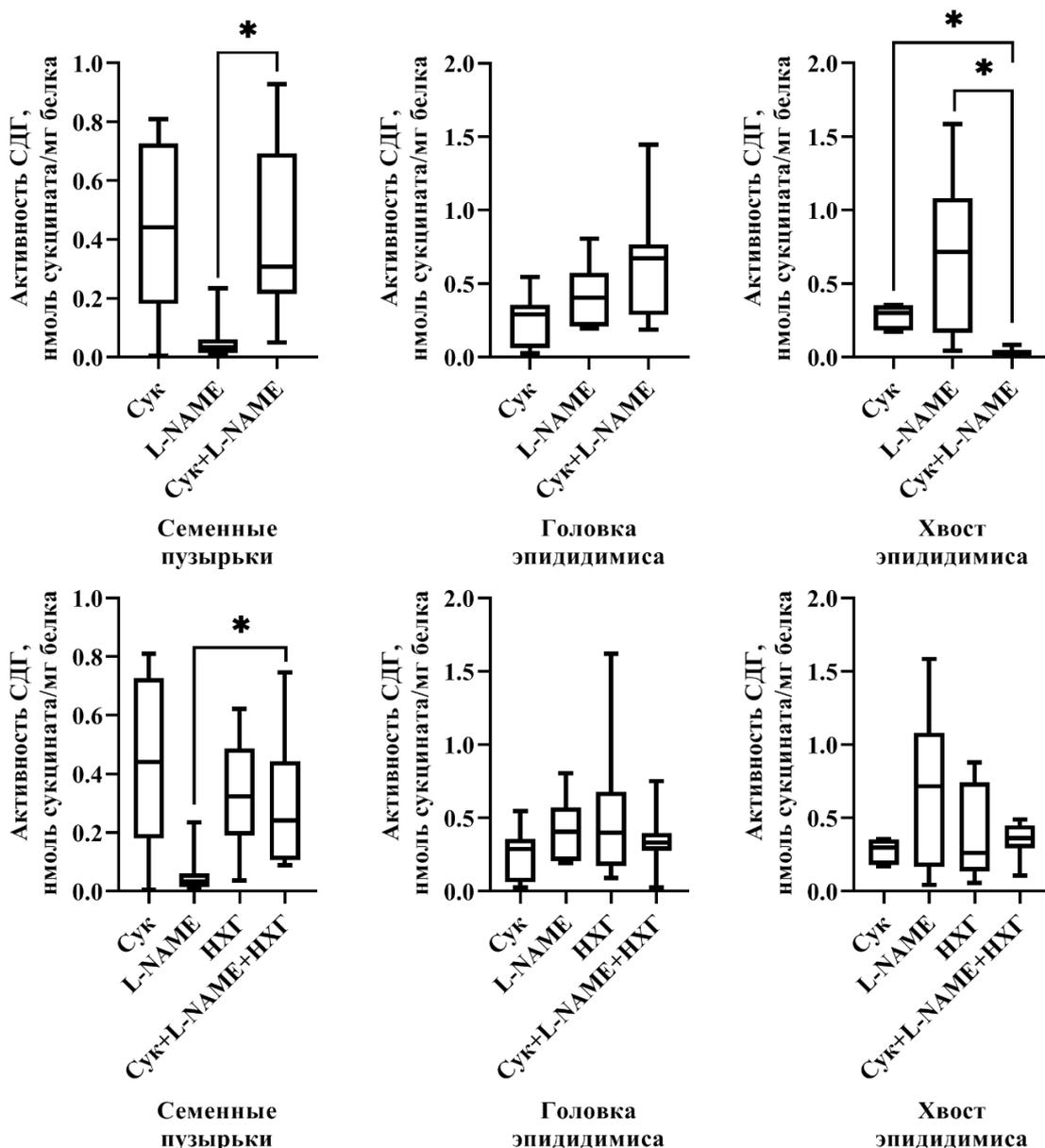


Рисунок 48 – Активность сукцинатдегидрогеназы при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината

Достоверное повышение в семенных пузырьках и снижение в хвосте эпидидимиса при сочетанном воздействии сукцината и L-NAME отмечалось также в содержании янтарной кислоты (Рисунок 49). Тенденция изменений показателей при назначении сукцината на фоне получения животными L-NAME – увеличение содержания сукцината в семенных пузырьках и снижение уровня янтарной кислоты в хвосте эпидидимиса – сохраняется и при введении в эксперимент моделирования гипоксии (Рисунок 49).

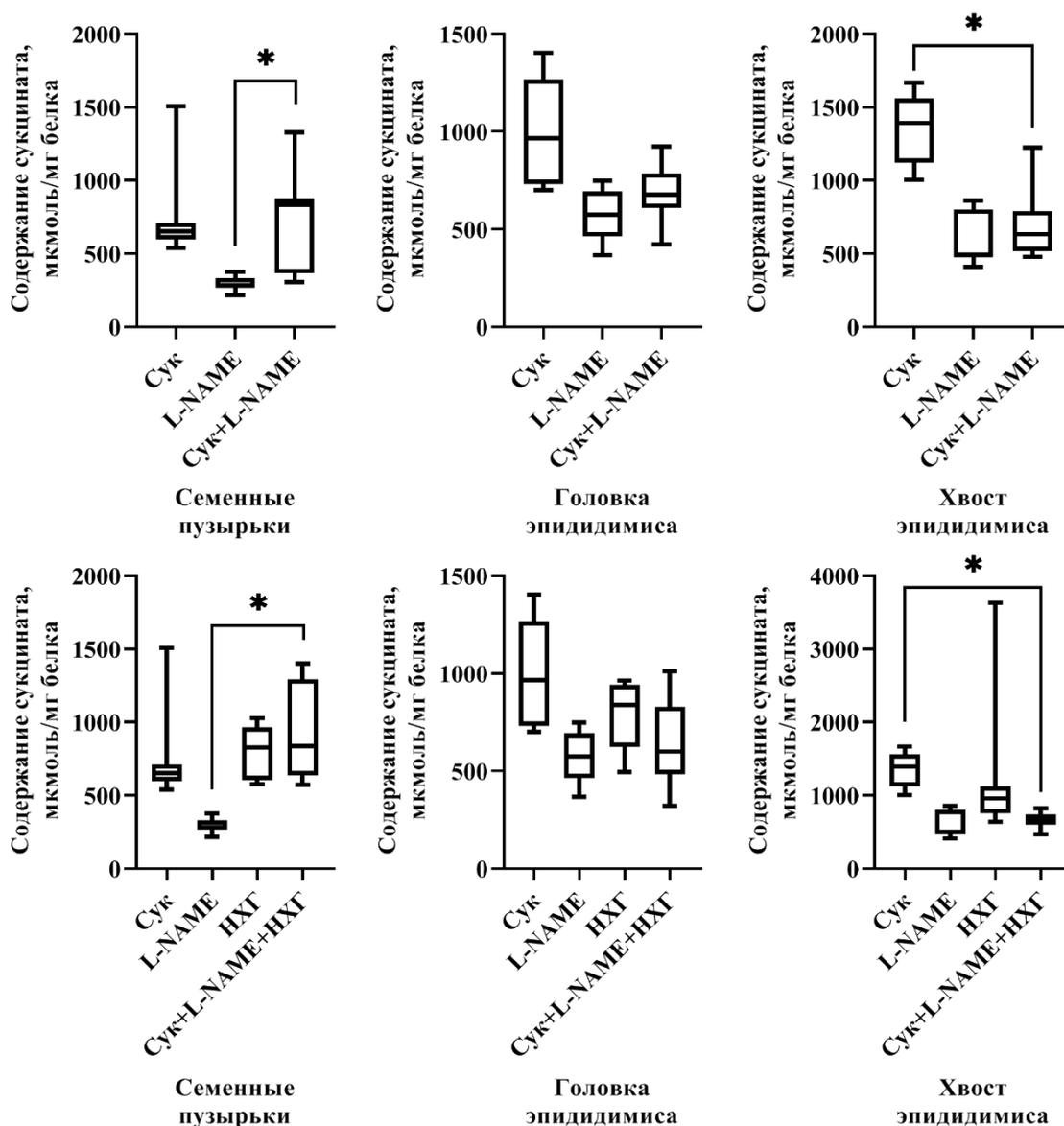


Рисунок 49 – Содержание сукцината в митохондриях при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината

В условиях экспериментального дефицита оксида азота (II) содержание сукцината снижалось во всех тканях (Рисунок 24), однако при этом получение экзогенного метаболита вызвало повышение его концентрации до уровня контроля только в семенных пузырьках.

Общая активность ЛДГ МФ статистически значимо повышалась только в головке эпидидимиса в условиях сочетанного действия сукцината, L-NAME-опосредованного дефицита NO и НХГ относительно состояния гипоксии (Таблица 17). Однако, несмотря на сохранение общей активности на уровне контрольных групп, распределение изоферментов менялось: в МФ семенных

пузырьков ЛДГ1 повышалось в группе Сук+L-NAME при сравнении с животными, получавшими только сукцинат, а в группе Сук+L-NAME+НХГ повышалось относительно Сук и относительно НХГ. В МФ эпидидимиса наблюдалось достоверное повышение ЛДГ1 как при сочетании Сук+L-NAME, так и при сочетании этих факторов с НХГ. В хвосте эпидидимиса фракция ЛДГ1 оказалось ниже в группе Сук+L-NAME и Сук+L-NAME+НХГ относительно только L-NAME, однако относительно Сук можно было отметить повышение этого изофермента. Доля ЛДГх МФ в обеих частях эпидидимиса снижалась при сочетанном воздействии трёх факторов. В ЦФ отмечалось повышение общей активности ЛДГ при сочетании Сук+L-NAME+НХГ во всех исследуемых тканях. При этом ЛДГ1 снижалась в семенных пузырьках и хвосте эпидидимиса, но повышалась в головке придатка яичка, а доля ЛДГх оказывалась выше, чем у животных, получавших или только сукцинат, или только L-NAME (Таблица 17).

Таблица 17 – 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, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината

Группы	Митохондриальная фракция		Цитоплазматическая фракция	
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	Общая ЛДГ	ЛДГ1
<b>Семенные пузырьки</b>				
<b>Группа 4: НХГ</b>	1124 [1003; 1379]	2,92 [2,66; 3,23]	1272 [1224; 2550]	3,89 [3,73; 4,11]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	507 [307; 817]	5,82 [5,42; 6,2]	1125 [709; 1899]	3,25 [3,15; 3,37]
<b>Группа 10: Сук</b>	803 [634; 960]	1,46 [1,23; 1,83]	1202 [824; 1658]	2,89 [2,79; 3]
<b>Группа 12: Сук+L-NAME</b>	887 [519; 1521] p <sub>6-12</sub> =0,12 p <sub>10-12</sub> =0,59	5,13 [4,78; 5,72] p <sub>6-12</sub> =0,1 p <sub>10-12</sub> =0,0009*↑	1704 [1425; 1767] p <sub>6-12</sub> =0,43 p <sub>10-12</sub> =0,49	2,93 [2,51; 3,1] p <sub>6-12</sub> =0,1 p <sub>10-12</sub> =0,71
<b>Группа 13: Сук+L-NAME+НХГ</b>	747 [463; 994] p <sub>4-13</sub> =0,04 p <sub>6-13</sub> =0,44 p <sub>10-13</sub> =0,57	8,81 [6,82; 10,58] p <sub>4-13</sub> =0,0009*↑ p <sub>6-13</sub> =0,1 p <sub>10-13</sub> =0,0009*↑	4260 [3581; 5795] p <sub>4-13</sub> =0,052 p <sub>6-13</sub> =0,007*↑ p <sub>10-13</sub> =0,003*↑	2,64 [2,53; 2,77] p <sub>4-13</sub> =0,0009*↓ p <sub>6-13</sub> =0,004*↓ p <sub>10-13</sub> =0,03

Группы	Митохондриальная фракция			Цитоплазматическая фракция		
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх
<b>Головка эпидидимиса</b>						
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	2166 [1812; 3389]	1,81 [1,51; 1,88]	13,53 [13,36; 13,63]	5098 [3768; 6106]	0,86 [0,73; 1,01]	8,03 [7,21; 8,6]
<b>Группа 10: Сук</b>	3177 [2870; 5200]	2,25 [2,22; 2,4]	12,47 [12,18; 12,53]	5096 [4303; 6127]	1,09 [0,87; 1,3]	6,02 [5,24; 6,81]
<b>Группа 12: Сук+L-NAME</b>	2509 [2062; 3270] p <sub>6-12</sub> =0,56 p <sub>10-12</sub> =0,13	3,44 [3,26; 3,87] p <sub>6-12</sub> =0,0009*↑ p <sub>10-12</sub> =0,0009*↑	11,19 [9,75; 12,48] p <sub>6-12</sub> =0,1 p <sub>10-12</sub> =0,23	5047 [3965; 6360] p <sub>6-12</sub> =0,96 p <sub>10-12</sub> =0,96	0,98 [0,69; 1,36] p <sub>6-12</sub> =0,71 p <sub>10-12</sub> =0,71	7,31 [6,73; 8,85] p <sub>6-12</sub> =1 p <sub>10-12</sub> =0,014*↑
<b>Группа 13: Сук+L-NAME+ НХГ</b>	2750 [2084; 3238] p <sub>4-13</sub> =0,0014*↑ p <sub>6-13</sub> =0,79 p <sub>10-13</sub> =0,16	4,5 [4,39; 5] p <sub>4-13</sub> =0,0009*↑ p <sub>6-13</sub> =0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> =0,0009*↑	9,22 [7; 11,37] p <sub>4-13</sub> =0,004*↓ p <sub>6-13</sub> =0,0009*↓ p <sub>10-13</sub> =0,1	5301 [4327; 5737] p <sub>4-13</sub> =0,007*↑ p <sub>6-13</sub> =0,96 p <sub>10-13</sub> =0,79	1,91 [1,74; 2,08] p <sub>4-13</sub> =0,23 p <sub>6-13</sub> =0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> =0,0009*↑	9,26 [6,47; 11,69] p <sub>4-13</sub> =0,0009*↓ p <sub>6-13</sub> =0,71 p <sub>10-13</sub> =0,1
<b>Хвост эпидидимиса</b>						
<b>Группы</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	1978 [1596; 2283]	8,48 [8,43; 8,55]	26,7 [25,4; 29,07]	4675 [3688; 5293]	6,29 [6,07; 6,44]	8,18 [7,4; 9,25]
<b>Группа 10: Сук</b>	3287 [1697; 4253]	2,82 [2,81; 2,95]	21,33 [20,35; 23,44]	3987 [2092; 8532]	6,85 [4,63; 9,8]	13,46 [11,8; 15,54]
<b>Группа 12: Сук+L-NAME</b>	982 [655; 2362] p <sub>6-12</sub> =0,066 p <sub>10-12</sub> =0,024	5,23 [4,45; 5,79] p <sub>6-12</sub> =0,0009*↓ p <sub>10-12</sub> =0,0019*↑	26,53 [24,9; 29,4] p <sub>6-12</sub> =0,71 p <sub>10-12</sub> =0,024	3368 [3112; 3546] p <sub>6-12</sub> =0,1 p <sub>10-12</sub> =0,96	3,43 [2,52; 4,10] p <sub>6-12</sub> =0,0009*↓ p <sub>10-12</sub> =0,014*↓	11,03 [9,95; 11,67] p <sub>6-12</sub> =0,041 p <sub>10-12</sub> =0,014*↓

Продолжение Таблицы 17

<b>Группа 13: Сук+ L-NAME+ НХГ</b>	2614 [2263; 3810]	4,84 [3,85; 5,51]	4,15 [3,6; 5,09]	7301 [6396; 8367]	3,42 [3,08; 3,76]	16,84 [13,42; 20,05]
	p <sub>4-13</sub> =0,71	p <sub>4-13</sub> =0,43	p <sub>4-13</sub> = 0,0009*↓	p <sub>4-13</sub> = 0,0009*↑	p <sub>4-13</sub> = 0,0009*↓	p <sub>4-13</sub> = 0,004*↑
	p <sub>6-13</sub> =0,79	p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↓	p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↓	p <sub>6-13</sub> = 0,004*↑	p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↓	p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑
	p <sub>10-13</sub> =0,64	p <sub>10-13</sub> = 0,024	p <sub>10-13</sub> = 0,0009*↓	p <sub>10-13</sub> =0,1	p <sub>10-13</sub> = 0,004*↓	p <sub>10-13</sub> = 0,43

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; L-NAME – животные, подвергшиеся моделированию дефицита оксида азота (II); Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

Несмотря на отсутствие достоверных изменений общей активности ЛДГ, при сочетанном действии сукцината и L-NAME отмечалось снижение содержания молочной кислоты в митохондриях и цитоплазме хвоста придатка яичка и цитоплазме семенных пузырьков (Таблица 18). В проксимальном отделе эпидидимиса достоверных изменений не выявлено.

Таблица 18 – Содержание лактата в митохондриальной и цитоплазматической фракциях семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината, в мкмоль/мг белка

Группы	Митохондриальная фракция	Цитоплазматическая фракция
<b>Семенные пузырьки</b>		
<b>Группа 4: НХГ</b>	1,76 [1,41; 1,96]	1,66 [1,2; 1,99]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	3,02 [1,91; 4,86]	2,04 [1,6; 2,7]
<b>Группа 10: Сук</b>	2,49 [1,58; 5,88]	2,03 [1,41; 2,78]
<b>Группа 12: Сук+L-NAME</b>	5,56 [1,95; 8,07] p <sub>6-12</sub> =0,37 p <sub>10-12</sub> =0,27	0,96 [0,83; 1,2] p <sub>6-12</sub> =0,0074*↓ p <sub>10-12</sub> =0,01*↓
<b>Группа 13: Сук+L-NAME+ НХГ</b>	2,83 [1,75; 4,19] p <sub>4-13</sub> =0,16 p <sub>6-13</sub> =0,96 p <sub>10-13</sub> =0,96	1 [0,68; 1,33] p <sub>4-13</sub> =0,19 p <sub>6-13</sub> =0,03 p <sub>10-13</sub> =0,04
<b>Хвост эпидидимиса</b>		
<b>Группа 4: НХГ</b>	4,38 [2,75; 6,55]	1,6 [1,58; 1,65]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	4,52 [3,73; 6,47]	2,34 [1,98; 2,64]
<b>Группа 10: Сук</b>	6,83 [5,97; 10,88]	3,86 [3,09; 4,33]

<b>Группа 12: Сук+L-NAME</b>	2,57 [2,02; 3,88] p <sub>6-12</sub> =0,13 p <sub>10-12</sub> =0,0028*↓	1,05 [0,9; 1,5] p <sub>6-12</sub> =0,018 p <sub>10-12</sub> =0,0009*↓
<b>Группа 13: Сук+L-NAME+ НХГ</b>	3,51 [3,13; 4,49] p <sub>4-13</sub> =0,96 p <sub>6-13</sub> =0,23 p <sub>10-13</sub> =0,0054*↓	2,11 [1,45; 2,75] p <sub>4-13</sub> =0,19 p <sub>6-13</sub> =0,7 p <sub>10-13</sub> =0,014

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; L-NAME – животные, подвергшиеся моделированию дефицита оксида азота (II); Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

Экзогенный сукцинат в условиях дефицита оксида азота (II), а также сочетанно с НХГ, вызывал понижение метаболитов NO в эпидидимисе, чего не наблюдалось в семенных пузырьках. В отношении содержания янтарной кислоты и активности СДГ в этих тканях наблюдалась подобная зависимость, что подтверждает вывод о регуляции активности комплекса II ЭТЦ оксидом азота (II).

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, при этом на фоне НХГ – снижение ЛДГ1 в цитоплазме семенных пузырьков и хвоста эпидидимиса, что на фоне повышения общей активности фермента свидетельствует об активации других изоформ, например, ЛДГх. Уменьшение доли ЛДГ1, преимущественно использующей в качестве субстрата молочную кислоту, вопреки ожидаемому, 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, а также всех трёх условий эксперимента (Рисунок 10).

### **3.6.3. Изменение биохимических показателей при назначении сукцината и L-аргинина**

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

содержании метаболитов NO только в митохондриях головки эпидидимиса: повышение в группе Сук+L-Арг против Сук (Рисунок 50).

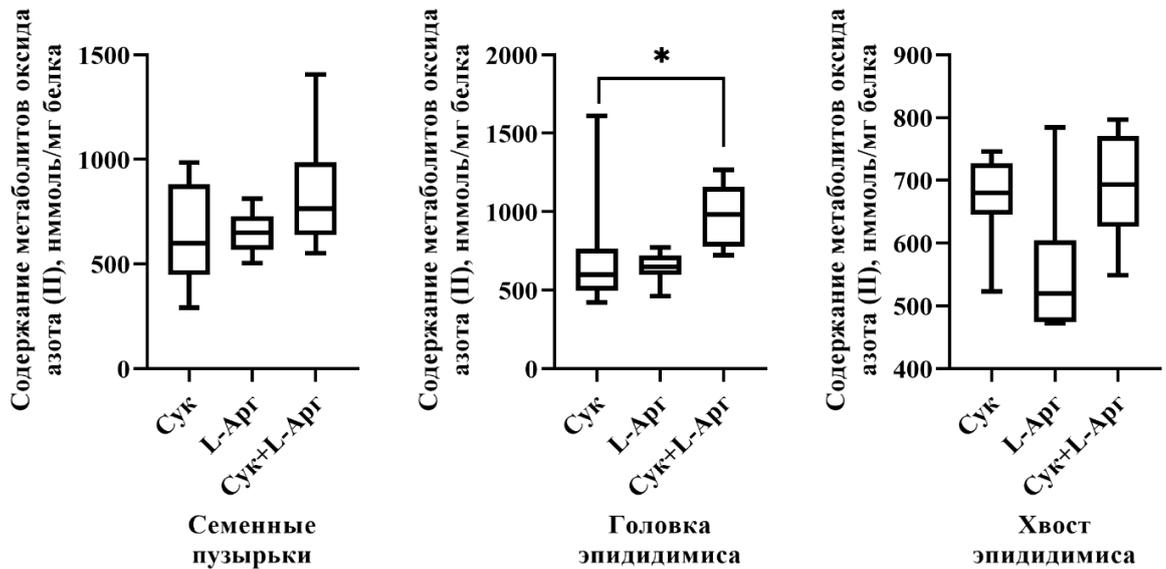


Рисунок 50 – Содержание  $\text{NO}_x$  в митохондриях при назначении L-аргинина и сукцината

Параллельное назначение сукцината и аргинина привело к понижению активности СДГ в тканях эпидидимиса (Рисунок 51). Но сочетание препаратов с моделированием гипоксии не вызвало изменений этого показателя. Также при данных экспериментальных моделях не выявлено статистически значимых изменений активности ЦО.

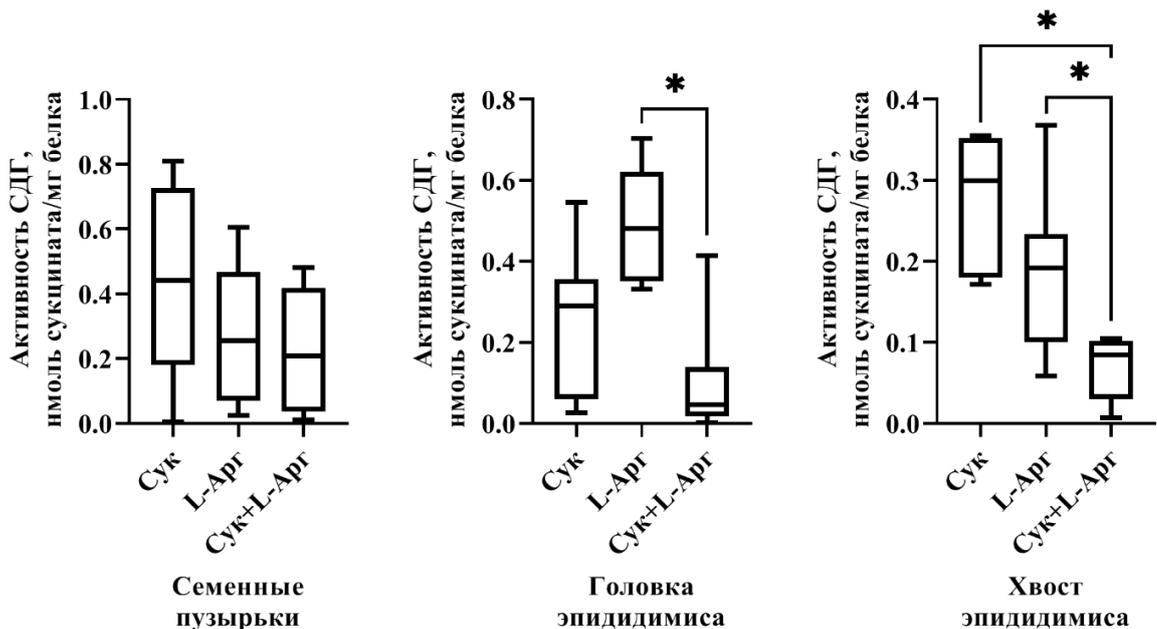


Рисунок 51 – Активность сукцинатдегидрогеназы при назначении L-аргинина и сукцината

Возможно, снижение активности фермента привело к накоплению его субстрата – янтарной кислоты, что отмечалось при исследовании митохондрий эпидидимиса животных, получавших экзогенные аргинин и сукцинат, а также получавших оба препарата и подвергавшихся воздействию гипоксии (Рисунок 52).

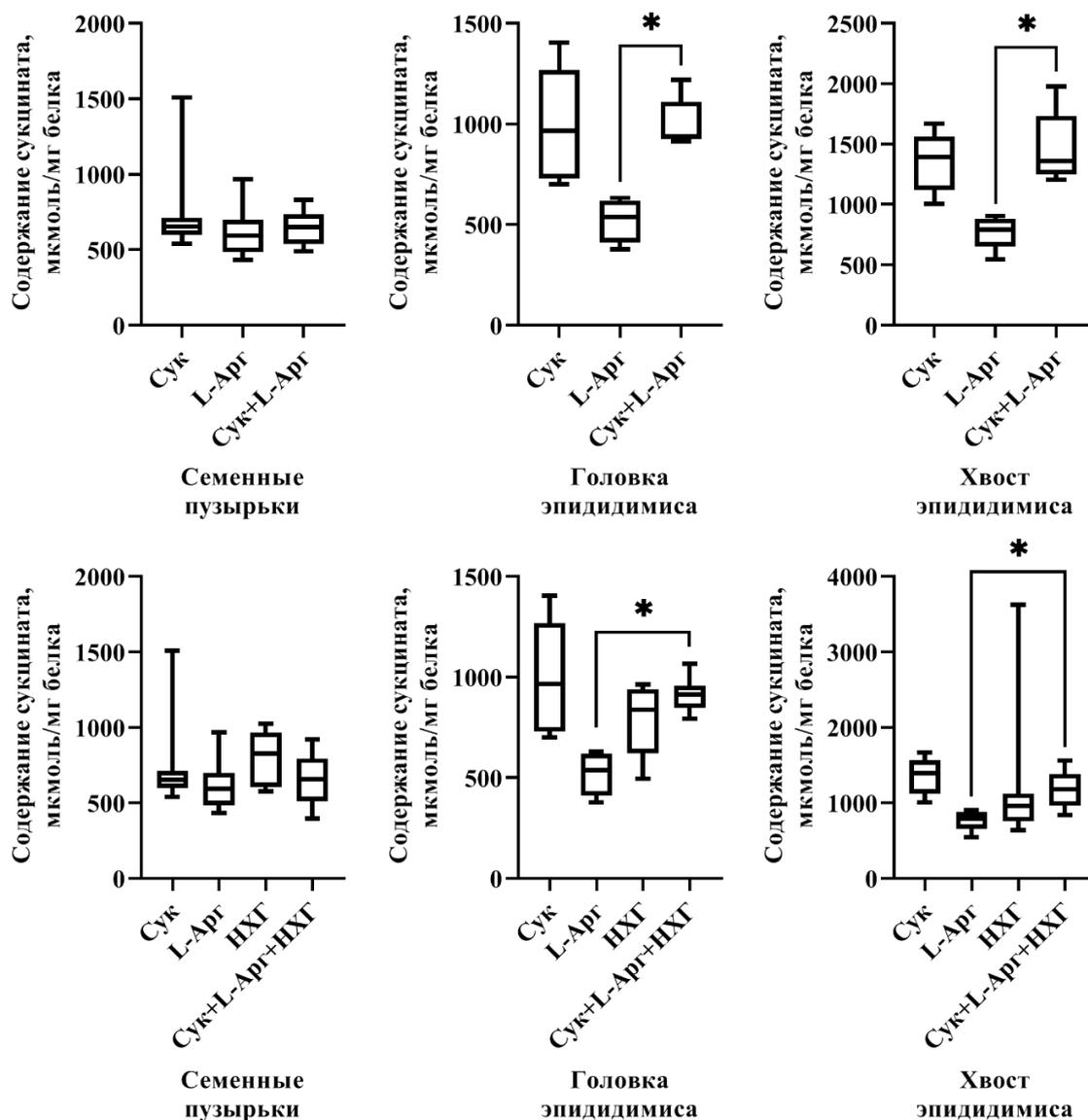


Рисунок 52 – Содержание сукцината в митохондриях при моделировании NHГ и назначении L-аргинина и сукцината

Сочетанное действие аргинина и сукцината на активность АТФ-синтазы отмечалось только в тканях эпидидимиса: в хвосте придатка яичка – повышение относительно обеих групп контроля; а в головке – повышение

относительно животных, получавших только сукцинат, но понижение относительно животных, получавших только аргинин (Рисунок 53).

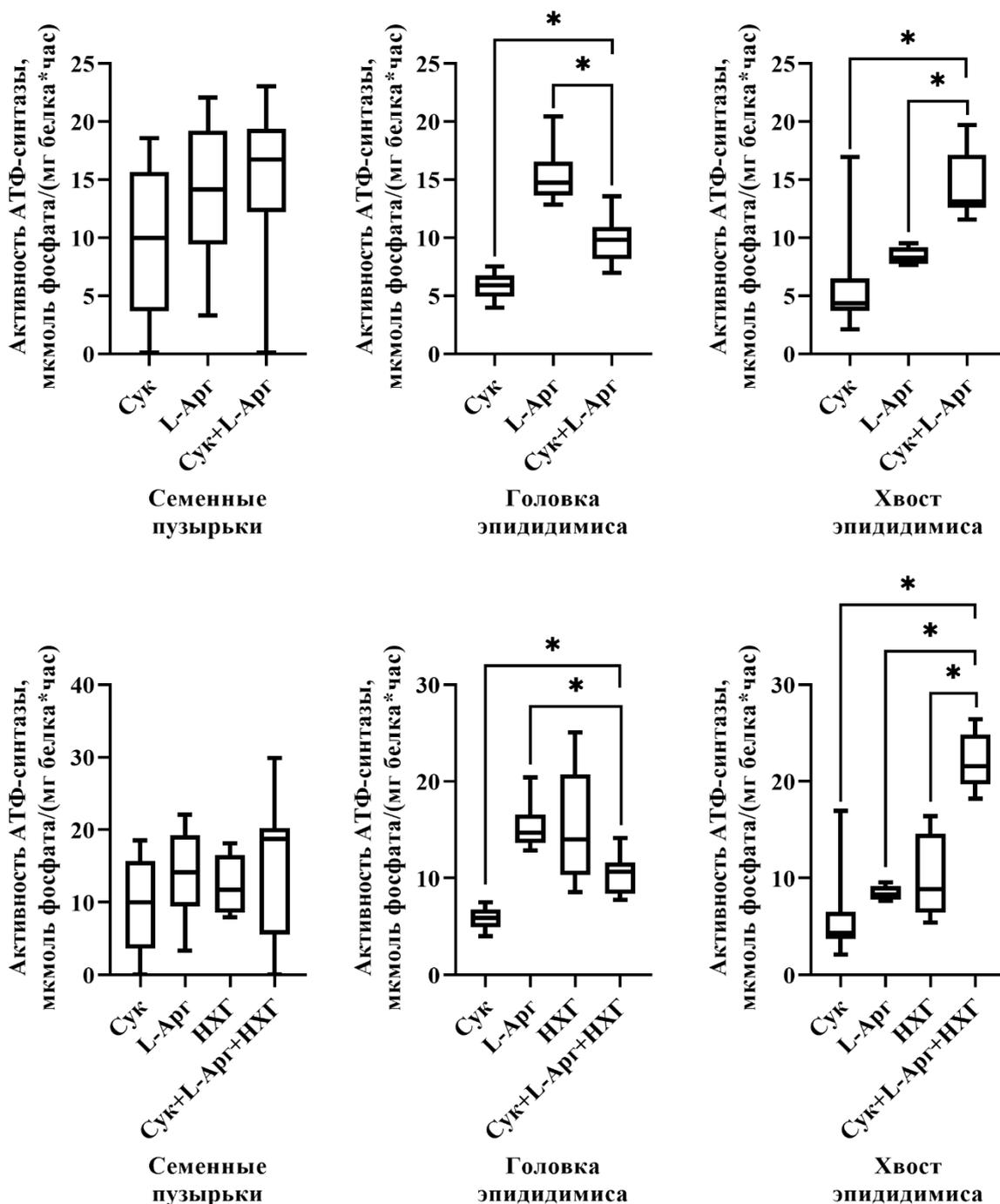


Рисунок 53 – Активность АТФ-синтазы при моделировании NHG и назначении L-аргинина и сукцината

Подобно действию аргинина и сукцината моделирование NHG при параллельном назначении этих препаратов привело к достоверному возрастанию активности АТФ-синтазы в дистальном отделе придатка яичка; в головке эпидидимиса способствовало возрастанию активности фермента

относительно животных, получавших только сукцинат, но убыванию относительно животных, получавших только аргинин (Рисунок 53).

Общая активность митохондриальной ЛДГ семенных пузырьков и ЛДГ МФ и ЦФ хвоста эпидидимиса значимо не изменялись. В цитоплазме семенных пузырьков и головки эпидидимиса отмечалось повышение активности фермента в группе Сук+L-Арг (Таблица 19).

Таблица 19 – 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 и назначении L-аргинина и сукцината

Группы	Митохондриальная фракция		Цитоплазматическая фракция			
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	Общая ЛДГ	ЛДГ1		
<b>Семенные пузырьки</b>						
Группа 4: НХГ	1124 [1003; 1379]	2,92 [2,66; 3,23]	1272 [1224; 2550]	3,89 [3,73; 4,11]		
Группа 8: L-Арг	565 [384; 783]	3,05 [2,74; 3,35]	3542 [1909; 5909]	2,17 [1,79; 2,37]		
Группа 10: Сук	803 [634; 960]	1,46 [1,23; 1,83]	1202 [824; 1658]	2,89 [2,79; 3]		
Группа 14: Сук+L-Арг	312 [188; 375] p <sub>8-14</sub> =0,08 p <sub>10-14</sub> =0,08	2,17 [1,87; 2,79] p <sub>8-14</sub> =0,1 p <sub>10-14</sub> =0,04	2852 [2354; 3318] p <sub>8-14</sub> =0,24 p <sub>10-14</sub> =0,0005*↑	1 [0,94; 1,1] p <sub>8-14</sub> =0,004*↓ p <sub>10-14</sub> =0,0009*↓		
Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ	255 [165; 1257] p <sub>4-15</sub> =0,16 p <sub>8-15</sub> =0,37 p <sub>10-15</sub> =0,56	7,73 [7,63; 9,09] p <sub>4-15</sub> =0,0009*↑ p <sub>8-15</sub> =0,0009*↑ p <sub>10-15</sub> =0,0009*↑	2580 [1877; 2948] p <sub>4-15</sub> =0,1 p <sub>8-15</sub> =0,14 p <sub>10-15</sub> =0,006*↑	1,75 [1,31; 2,16] p <sub>4-15</sub> =0,0009*↓ p <sub>8-15</sub> =0,23 p <sub>10-15</sub> =0,0009*↓		
Группы	Митохондриальная фракция			Цитоплазматическая фракция		
	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх	Общая ЛДГ	ЛДГ1	ЛДГх
<b>Головка эпидидимиса</b>						
Группа 4: НХГ	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]
Группа 8: L-Арг	1741 [1438; 2627]	5,18 [5,05; 5,2]	9,93 [7,29; 14,29]	4607 [4010; 5515]	2,44 [2,38; 2,53]	8,44 [7,94; 9,54]
Группа 10: Сук	3177 [2870; 5200]	2,25 [2,22; 2,4]	12,47 [12,18; 12,53]	5096 [4303; 6127]	1,09 [0,87; 1,3]	6,02 [5,24; 6,81]

Продолжение Таблицы 19

<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	2956 [2247; 3409] $p_{8-14}=0,19$ $p_{10-14}=0,49$	4,49 [4,28; 4,65] $p_{8-14}=0,004*\downarrow$ $p_{10-14}=0,0009*\uparrow$	16,15 [15,34; 17,6] $p_{8-14}=0,1$ $p_{10-14}=0,0009*\uparrow$	20983 [8186; 30255] $p_{8-14}=0,007*\uparrow$ $p_{10-14}=0,007*\uparrow$	2,14 [1,74; 2,52] $p_{8-14}=0,43$ $p_{10-14}=0,0009*\uparrow$	9,75 [7,57; 12,47] $p_{8-14}=1$ $p_{10-14}=0,004*\uparrow$
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	2455 [1180; 3115] $p_{4-15}=0,024$ $p_{8-15}=0,87$ $p_{10-15}=0,13$	3,36 [3,12; 3,59] $p_{4-15}=0,004*\uparrow$ $p_{8-15}=0,0009*\downarrow$ $p_{10-15}=0,004*\uparrow$	12,6 [8; 17,09] $p_{4-15}=0,43$ $p_{8-15}=0,71$ $p_{10-15}=1$	5788 [4580; 6519] $p_{4-15}=0,01$ $p_{8-15}=0,27$ $p_{10-15}=0,71$	2,85 [2,67; 2,98] $p_{4-15}=0,0009*\uparrow$ $p_{8-15}=0,014$ $p_{10-15}=0,0009*\uparrow$	7,52 [5,54; 10,31] $p_{4-15}=0,004*\downarrow$ $p_{8-15}=0,71$ $p_{10-15}=0,23$
<b>Хвост эпидидимиса</b>						
<b>Группы</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>	<b>Общая ЛДГ</b>	<b>ЛДГ1</b>	<b>ЛДГх</b>
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	3456 [2993; 3895]	3,33 [3,2; 3,52]	3,88 [3,6; 4,27]	8375 [7407; 10510]	3,55 [3,18; 3,85]	13,18 [12,51; 13,92]
<b>Группа 10: Сук</b>	3287 [1697; 4253]	2,82 [2,81; 2,95]	21,33 [20,35; 23,44]	3987 [2092; 8532]	6,85 [4,63; 9,8]	13,46 [11,8; 15,54]
<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	3007 [1824; 4402] $p_{8-14}=0,87$ $p_{10-14}=0,87$	3,5 [2,79; 3,9] $p_{8-14}=0,87$ $p_{10-14}=0,49$	4,41 [4,24; 4,51] $p_{8-14}=0,16$ $p_{10-14}=0,0009*\downarrow$	9282 [6784; 10440] $p_{8-14}=0,96$ $p_{10-14}=0,16$	3,8 [3,55; 4,33] $p_{8-14}=0,1$ $p_{10-14}=0,041$	12,13 [10,53; 13,67] $p_{8-14}=0,23$ $p_{10-14}=0,1$
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	4136 [3016; 7030] $p_{4-15}=0,32$ $p_{8-15}=0,32$ $p_{10-15}=0,27$	3,94 [3,63; 4,28] $p_{4-15}=0,0009*\downarrow$ $p_{8-15}=0,014$ $p_{10-15}=0,004*\uparrow$	6,69 [5,44; 8,69] $p_{4-15}=0,0009*\downarrow$ $p_{8-15}=0,004*\uparrow$ $p_{10-15}=0,0009*\downarrow$	4116 [3466; 4966] $p_{4-15}=0,37$ $p_{8-15}=0,03$ $p_{10-15}=0,87$	4,78 [4,73; 4,89] $p_{4-15}=0,1$ $p_{8-15}=0,0009*\uparrow$ $p_{10-15}=0,23$	12,04 [11,69; 12,58] $p_{4-15}=0,041$ $p_{8-15}=0,1$ $p_{10-15}=0,23$

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргинина; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

В группе Сук+L-Арг+НХГ достоверно повышалась доля ЛДГ1 МФ семенных пузырьков, но ЛДГ1 ЦФ при этом снижалась. В головке эпидидимиса

при получении аргинина и сукцината одновременно и в сочетании с гипоксией отмечалось повышение ЛДГ1 относительно группы животных, получавших только сукцинат. В хвосте эпидидимиса этой закономерности не обнаружено, но установлено, что достоверно снижалась доля ЛДГх МФ (Таблица 19).

По сравнению с группой животных, получавших только янтарную кислоту, при действии экзогенного аргинина и сукцината наблюдалось повышение лактата в МФ семенных пузырьков и ЦФ головки эпидидимиса (Таблица 20). При сочетании введения обоих веществ на фоне НХГ отмечалось достоверное повышение лактата в МФ и ЦФ проксимального отдела и ЦФ дистального отдела придатка яичка, но в МФ последнего установлено снижение показателя (Таблица 20).

Таблица 20 – Содержание лактата в митохондриальной и цитоплазматической фракциях семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и назначении L-аргинина и сукцината, в мкмоль/мг белка

Группы	Митохондриальная фракция	Цитоплазматическая фракция
<b>Семенные пузырьки</b>		
<b>Группа 4: НХГ</b>	1,76 [1,41; 1,96]	1,66 [1,2; 1,99]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	2,59 [2,27; 2,99]	2,76 [1,6; 3,66]
<b>Группа 10: Сук</b>	2,49 [1,58; 5,88]	2,03 [1,41; 2,78]
<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	4,38 [3,79; 4,7] p <sub>8-14</sub> =0,007*↑ p <sub>10-14</sub> =0,31	2,74 [0,98; 3,44] p <sub>8-14</sub> =0,56 p <sub>10-14</sub> =0,64
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	5,56 [3,84; 5,97] p <sub>4-15</sub> =0,018 p <sub>8-15</sub> =0,052 p <sub>10-15</sub> =0,49	1,83 [1,59; 2,06] p <sub>4-15</sub> =0,71 p <sub>8-15</sub> =0,27 p <sub>10-15</sub> =0,56
<b>Головка эпидидимиса</b>		
<b>Группа 4: НХГ</b>	2,64 [2,23; 3,03]	1,94 [1,66; 2,2]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	2,72 [1,71; 5,36]	2,61 [2,41; 2,79]
<b>Группа 10: Сук</b>	3,89 [2,98; 4,99]	2,14 [1,52; 2,54]
<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	7,1 [5,8; 8,63] p <sub>8-14</sub> =0,03 p <sub>10-14</sub> =0,08	6,45 [3,56; 13,02] p <sub>8-14</sub> =0,018 p <sub>10-14</sub> =0,0038*↑
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	7,07 [4,56; 8,38] p <sub>4-15</sub> =0,0009*↑ p <sub>8-15</sub> =0,024 p <sub>10-15</sub> =0,04	3,44 [2,93; 3,93] p <sub>4-15</sub> =0,0014*↑ p <sub>8-15</sub> =0,014 p <sub>10-15</sub> =0,0019*↑

<b>Хвост эпидидимиса</b>		
<b>Группа 4: НХГ</b>	4,38 [2,75; 6,55]	1,6 [1,58; 1,65]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	3,07 [2,69; 5,1]	3,95 [1,95; 4,63]
<b>Группа 10: Сук</b>	6,83 [5,97; 10,88]	3,86 [3,09; 4,33]
<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	7,34 [5,32; 10,29] p <sub>8-14</sub> =0,1 p <sub>10-14</sub> =0,56	2,54 [1,6; 3,57] p <sub>8-14</sub> =0,27 p <sub>10-14</sub> =0,08
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	2,61 [2,26; 4,21] p <sub>4-15</sub> =0,23 p <sub>8-15</sub> =0,56 p <sub>10-15</sub> =0,0074*↓	2,8 [2,69; 3,4] p <sub>4-15</sub> =0,0009*↑ p <sub>8-15</sub> =0,87 p <sub>10-15</sub> =0,64

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргинина; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

При получении животными экзогенных сукцината и L-аргинина отмечалось снижение активности СДГ, но повышение уровня янтарной кислоты в эпидидимисе, что также указывает на способность оксида азота (II) контролировать реверсивную работу этого фермента. Однако эффекты L-аргинина в присутствии сукцината, а также в сочетании с НХГ отмечаются и в отношении активности АТФ-синтазы эпидидимиса: в головке – повышение, относительно контроля сукцината, а в хвосте – относительно всех контрольных групп. Таким образом, продемонстрировано, что сохранение оксида азота (II) при назначении L-аргинина и в присутствии сукцината способствует активации окислительного фосфорилирования, поддерживая работу ЭТЦ в условиях кислорододефицита, в том числе за счёт реверсивного движения электронов через СДГ.

Кроме того, в обсуждаемых условиях отмечалось повышение уровня молочной кислоты в цитоплазме клеток (Таблица 20) и снижение этого метаболита в плазме крови (Рисунок 11), что указывает на преимущественно внутриклеточное использование лактата. Причём повышение ЛДГ1 МФ также указывает на возможность подключения молочной кислоты к энергетическому обмену даже в присутствии сукцината.

### 3.7. ИЗМЕНЕНИЕ СТЕПЕНИ КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И В УСЛОВИЯХ НАЗНАЧЕНИЯ СУКЦИНАТА

#### 3.7.1. Изменение степени карбонилирования белков при назначении сукцината

Назначение сукцината в виде внутривентральных инъекций привело к увеличению содержания 2,4-ДНФГ-производных аминокислот основного характера в белках митохондрий семенных пузырьков, но без статистически значимого отличия в общей фракции ОМБ, в митохондриях эпидидимиса отмечался также рост производных нейтральных аминокислот, что в сумме определило повышение общей ОМБ (Таблица 21). Однако в условиях НХГ сукцинат способствовал снижению окислительного повреждения белков митохондрий эпидидимиса по сравнению с животными, подвергшимися воздействию только гипоксии (Таблица 21).

Таблица 21 – Площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот в белках митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и назначении сукцината, в у.е./мг белка

Группы	S <sub>АДНФГ нейт</sub>	S <sub>АДНФГ осн</sub>	S <sub>КДНФГ нейт</sub>	S <sub>КДНФГ осн</sub>	Собщ
<b>Семенные пузырьки</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	16,48 [13,64; 18,14]	2,87 [2,68; 3,38]	4,24 [3,38; 4,48]	0,44 [0,39; 0,53]	24,76 [20,08; 26,08]
<b>Группа 5: NaCl</b>	8,15 [7,71; 9,55]	0,8 [0,75; 1,02]	2,38 [2,25; 2,55]	0,09 [0,08; 0,15]	11,42 [10,78; 13,45]
<b>Группа 10: Сук</b>	6,96 [3,87; 8,16] p <sub>5-10</sub> =0,1	1,1 [1,06; 2,22] p <sub>5-10</sub> = 0,018*↑	1,93 [1,31; 8,69] p <sub>5-10</sub> =0,37	0,19 [0,15; 0,3] p <sub>5-10</sub> =0,01*↑	11,09 [6,37; 13,61] p <sub>5-10</sub> =0,64
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	8,59 [6,6; 19,44] p <sub>4-11</sub> =0,19 p <sub>10-11</sub> =0,13	2,12 [1,28; 5,63] p <sub>4-11</sub> =0,49 p <sub>10-11</sub> =0,32	2,54 [2,26; 8,17] p <sub>4-11</sub> =0,37 p <sub>10-11</sub> =0,16	0,33 [0,17; 0,89] p <sub>4-11</sub> =0,49 p <sub>10-11</sub> =0,37	12,88 [11,28; 34,13] p <sub>4-11</sub> =0,32 p <sub>10-11</sub> =0,19
<b>Головка эпидидимиса</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	295,2 [228,97; 336,5]	8,77 [6,27; 10,62]	11,86 [7,36; 12,64]	1,46 [1,07; 1,85]	319,12 [241; 363,6]

Продолжение Таблицы 21

<b>Группа 5: NaCl</b>	8,88 [7,88; 10,04]	0,86 [0,81; 1,23]	1,68 [1,46; 1,97]	0,152 [0,12; 0,19]	11,81 [10,14; 13,38]
<b>Группа 10: Сук</b>	12,94 [11,09; 16,23] p <sub>5-10</sub> = 0,024*↑	2,53 [2,42; 3,43] p <sub>5-10</sub> = 0,0009*↑	3,51 [3,7; 3,63] p <sub>5-10</sub> = 0,0014*↑	0,35 [0,28; 0,56] p <sub>5-10</sub> = 0,0009*↑	19,31 [16,97; 24,14] p <sub>5-10</sub> =0,004*↑
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	12,27 [11,33; 14,97] p <sub>4-11</sub> = 0,0009*↓ p <sub>10-11</sub> =0,87	2,9 [2,43; 3,39] p <sub>4-11</sub> = 0,0019*↓ p <sub>10-11</sub> =0,71	3,81 [3,38; 4,27] p <sub>4-11</sub> = 0,0009*↓ p <sub>10-11</sub> =0,56	1,76 [1,58; 2,04] p <sub>4-11</sub> =0,27 p <sub>10-11</sub> = 0,0019*↑	20,96 [19,82; 23,78] p <sub>4-11</sub> = 0,0009*↓ p <sub>10-11</sub> =0,43
<b>Хвост эпидидимиса</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	28,84 [24,19; 30] p <sub>3-4</sub> =0,1	5,16 [4,9; 6,09] p <sub>3-4</sub> =0,16	6,46 [6,09; 7,03] p <sub>3-4</sub> =0,16	0,849 [0,71; 0,9] p <sub>3-4</sub> =0,32	41,28 [36,4; 43,57] p <sub>3-4</sub> =0,1
<b>Группа 5: NaCl</b>	5,35 [3,49; 6,01]	2,11 [1,81; 2,19]	2,54 [2,49; 2,7]	0,31 [0,3; 0,36]	10,37 [7,94; 11,18]
<b>Группа 10: Сук</b>	11,48 [10,46; 12,88] p <sub>5-10</sub> = 0,005*↑	3,63 [3,44; 4,06] p <sub>5-10</sub> = 0,007*↑	4,66 [4,24; 5,06] p <sub>5-10</sub> = 0,0009*↑	0,57 [0,49; 0,61] p <sub>5-10</sub> =0,031	20,09 [19,16; 22,48] p <sub>5-10</sub> =0,005*↑
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	10,98 [10,18; 12,2] p <sub>4-11</sub> = 0,0009*↓ p <sub>10-11</sub> =0,64	3,11 [2,82; 4,08] p <sub>4-11</sub> = 0,003*↓ p <sub>10-11</sub> =0,56	3,96 [3,65; 5,45] p <sub>4-11</sub> =0,003*↓ p <sub>10-11</sub> =0,43	0,45 [0,42; 0,6] p <sub>4-11</sub> =0,004*↓ p <sub>10-11</sub> =0,64	18,77 [17,39; 21,9] p <sub>4-11</sub> = 0,0009*↓ p <sub>10-11</sub> =0,49

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группе 10; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

Прирост ОМБ митохондрий эпидидимиса на фоне получения животными экзогенного сукцината сопровождался снижением РАП (Рисунок 54), и в условиях сочетанного влияния сукцината и НХГ уровень РАП достоверно не изменялся. В семенных пузырьках, где сукцинат не повлиял на изменение общей ОМБ даже в условиях гипоксии, РАП в серии Сук+НХГ оказался меньше, чем в группе НХГ (Рисунок 54).

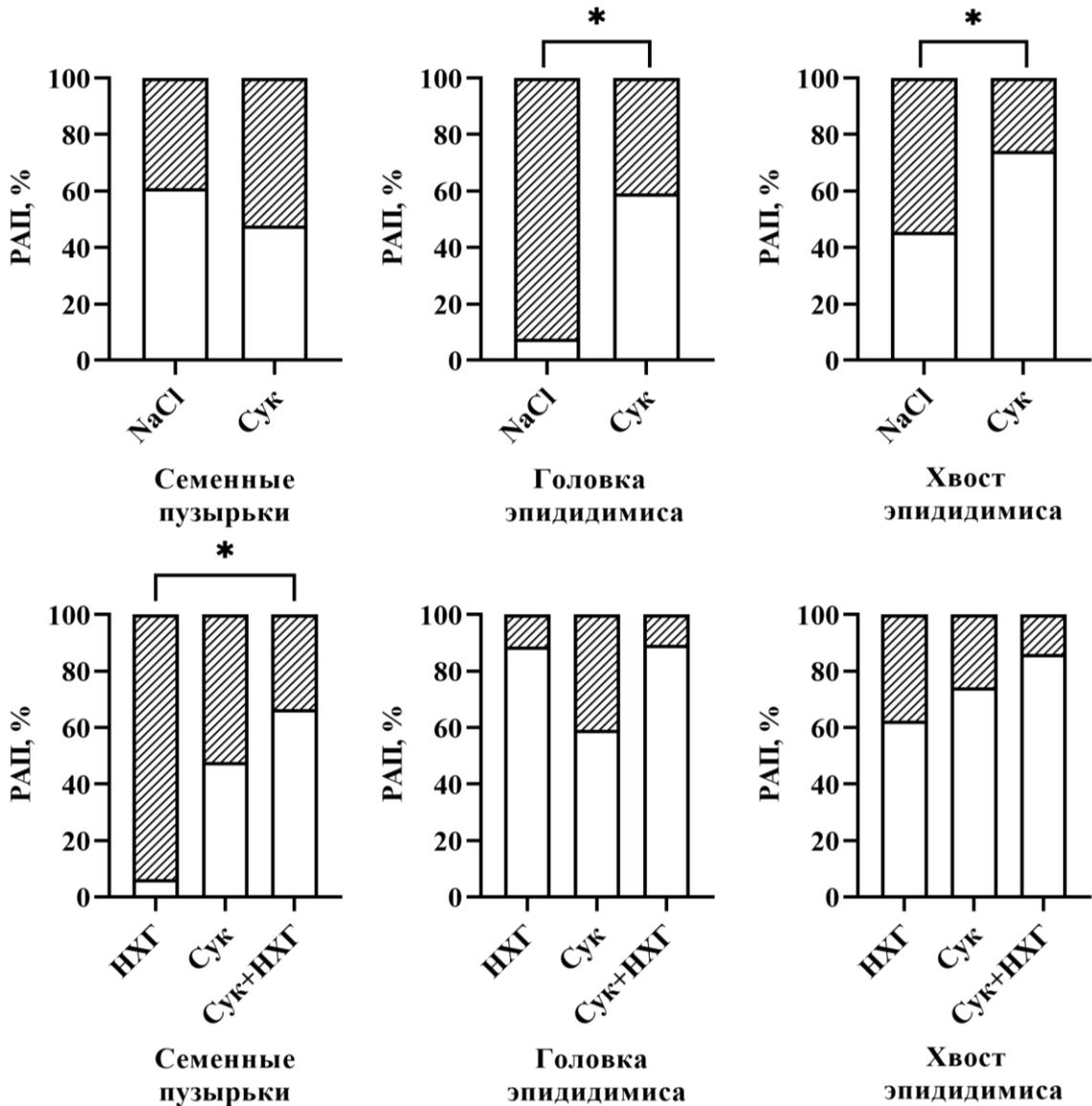


Рисунок 54 – Сравнение изменения резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий (РАП) при моделировании HХГ и назначении сукцината

Введение животным экзогенного сукцината не повлияло на активность СОД, но сочетание курса инъекций препарата с гипоксией способствовало сохранению активности фермента на уровне контрольной группы (Рисунок 55).

Сукцинат проявляет антиоксидантные свойства в условиях гипоксии, способствуя снижению окислительной модификации белков и повышению активности супероксиддисмутазы, при этом резервно-адаптационный потенциал ОМБ существенно не меняется.

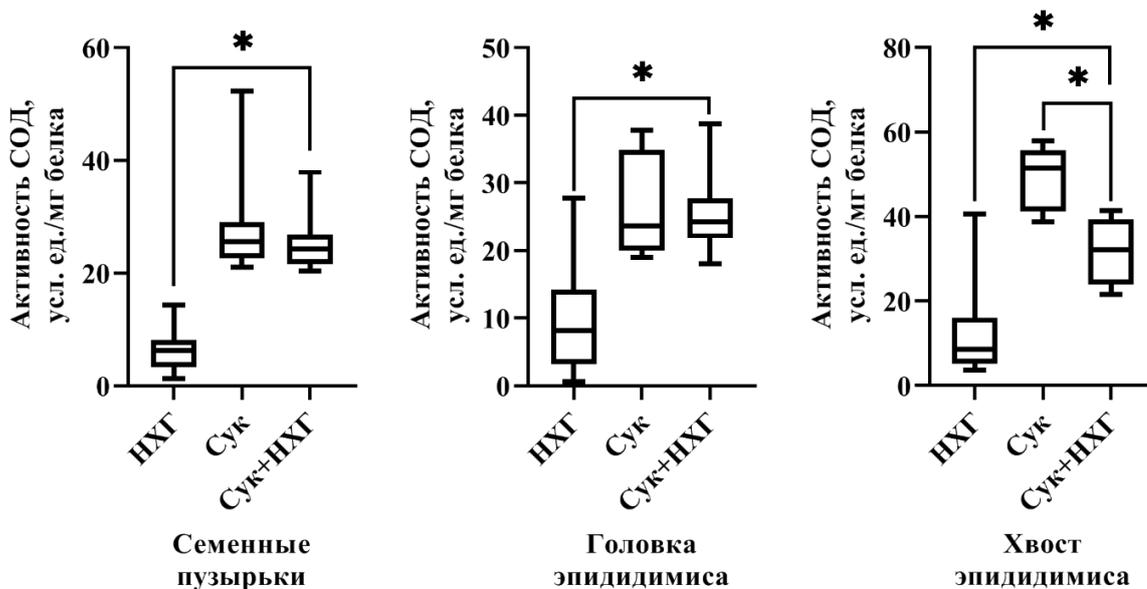


Рисунок 55 – Активность супероксиддисмутазы при моделировании НХГ и назначении сукцината

### 3.7.2. Изменение степени карбонилирования белков при назначении сукцината и при моделировании L-NAME-опосредованного дефицита оксида азота (II)

В семенных пузырьках сочетанное введение сукцината и L-NAME способствовало повышению окислительной модификации белков, эффект взаимного действия препаратов отмечался и при моделировании гипоксии (Таблица 22).

Таблица 22 – 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	S <sub>АДФГ нейт</sub>	S <sub>АДФГ осн</sub>	S <sub>КДФГ нейт</sub>	S <sub>КДФГ осн</sub>	Собщ
<b>Семенные пузырьки</b>					
Группа 4: НХГ	16,48 [13,64; 18,14]	2,87 [2,68; 3,38]	4,24 [3,38; 4,48]	0,44 [0,39; 0,53]	24,76 [20,08; 26,08]
Группа 6: L-NAME	10,27 [9,52; 12,4]	2,21 [2,06; 2,39]	3,02 [2,81; 3,155]	0,30 [0,278; 0,32]	15,96 [14,69; 18,04]
Группа 10: Сук	6,96 [3,87; 8,16]	1,1 [1,06; 2,22]	1,93 [1,31; 8,69]	0,19 [0,15; 0,3]	11,09 [6,37; 13,61]

Продолжение Таблицы 22

<b>Группа 12: Сук+L-NAME</b>	27,49 [15,28; 30,32] p <sub>6-12</sub> = 0,01*↑ p <sub>10-12</sub> = 0,004*↑	5,42 [2,96; 6,99] p <sub>6-12</sub> = 0,014*↑ p <sub>10-12</sub> = 0,004*↑	8,88 [4,42; 9,33] p <sub>6-12</sub> =0,014*↑ p <sub>10-12</sub> = 0,003*↑	0,69 [0,38; 1,07] p <sub>6-12</sub> =0,01*↑ p <sub>10-12</sub> =0,01*↑	42,94 [22,97; 47,15] p <sub>6-12</sub> =0,01*↑ p <sub>10-12</sub> = 0,004*↑
<b>Группа 13: Сук+ L-NAME+НХГ</b>	23,92 [21,84; 28,5] p <sub>4-13</sub> =0,013 p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0009*↑	6,64 [5,76; 7,79] p <sub>4-13</sub> = 0,002*↑ p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0009*↑	6,93 [5,88; 8,34] p <sub>4-13</sub> =0,01 p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0009*↑	1,17 [0,95; 1,37] p <sub>4-13</sub> =0,004*↑ p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0009*↑	38,76 [34,62; 45,67] p <sub>4-13</sub> =0,018 p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0009*↑
<b>Головка эпидидимиса</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	295,2 [228,97; 336,5]	8,77 [6,27; 10,62]	11,86 [7,36; 12,64]	1,46 [1,07; 1,85]	319,12 [241; 363,6]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	12,24 [10,72; 14,81]	3,02 [2,64; 3,33]	3,9 [3,37; 4,14]	0,44 [0,35; 0,49]	19,33 [16,72; 22,78]
<b>Группа 10: Сук</b>	12,94 [11,09; 16,23]	2,53 [2,42; 3,43]	3,51 [3,7; 3,63]	0,35 [0,28; 0,56]	19,31 [16,97; 24,14]
<b>Группа 12: Сук+L-NAME</b>	18,28 [17,5; 24,95] p <sub>6-12</sub> = 0,0238 p <sub>10-12</sub> =0,08	5,22 [4,48; 6,5] p <sub>6-12</sub> = 0,01*↓ p <sub>10-12</sub> =0,041	5,17 [4,59; 7,11] p <sub>6-12</sub> =0,03 p <sub>10-12</sub> =0,052	0,9 [0,77; 1,15] p <sub>6-12</sub> =0,005*↑ p <sub>10-12</sub> =0,041	29,54 [26,91; 40,12] p <sub>6-12</sub> =0,024 p <sub>10-12</sub> =0,052
<b>Группа 13: Сук+ L-NAME+НХГ</b>	142,37 [135,3; 149,9] p <sub>4-13</sub> = 0,007*↓ p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0009*↑	4,1 [3,46; 5,2] p <sub>4-13</sub> =0,046 p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0014*↑	4,23 [3,39; 5,16] p <sub>4-13</sub> =0,024 p <sub>6-13</sub> =0,007*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0019*↑	0,71 [0,58; 0,93] p <sub>4-13</sub> =0,052 p <sub>6-13</sub> =0, 0009*↑ p <sub>10-13</sub> =0,0014	151,72 [143,2; 160,3] p <sub>4-13</sub> =0,01 p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-13</sub> = 0,0009*↑

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; L-NAME – животные, подвергшиеся моделированию дефицита оксида азота (II); Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

В головке эпидидимиса влияние сукцината на фоне дефицита оксида азота (II) не приводило к изменению степени карбонилирования белков, но при сочетанном действии Сук+L-NAME+НХГ отмечалось снижение АДНФГнейт относительно животных, подвергшихся только гипоксии, но рост всех форм ОМБ, в том числе общей, по сравнению с группами Сук и L-NAME (Таблица

22). В хвосте эпидидимиса в обсуждаемых условиях статистически значимых отличий не выявлено.

Резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков в митохондриях семенных пузырьков при назначении сукцината на фоне экспериментального дефицита оксида азота (II) статистически значимо не отличался от полученных результатов для группы животных, подвергшихся только действию L-NAME (Рисунок 56). Однако при действии трёх факторов Сук+L-NAME+НХГ уровень РАП существенно увеличивался, приближаясь к значениям контрольной группы НХГ (Рисунок 56).

В эпидидимисе сочетанное действие Сук+L-NAME приводило к повышению уровня РАП в обеих частях органа (Рисунок 56). Но использование препаратов на фоне моделирования гипоксии вызывало увеличение РАП только в хвосте придатка яичка (Рисунок 56).

Активность СОД семенных пузырьков достоверно повышалась в экспериментальной серии Сук+L-NAME относительно контрольной серии L-NAME, но не изменялась при сочетании Сук+L-NAME+НХГ (Рисунок 57).

В эпидидимисе статистически значимые отличия наблюдались только в дистальном отделе: сукцинат, применяемый, как на фоне только экспериментального дефицита оксида азота (II), так и на фоне L-NAME+НХГ, вызывал снижение активности фермента (Рисунок 57).

Известно, что сукцинат способствует более длительному существованию оксида азота, и при ингибировании NO-синтазы усиливает поглощение кислорода митохондриями [40, 173, 227]. Нарушение циклов преобразования активных форм кислорода и азота может приводить к их непосредственному взаимодействию с образованием пероксинитритов, оказывающих сильное цитотоксическое действие [203, 228, 265]. Поскольку эффекты сукцината на фоне снижения NO связаны с сохранением активности ферментов ЭТЦ, мы полагаем, что повышение потребления митохондриями кислорода в сочетании с компенсацией синтеза оксида азота (II) формирует благоприятные условия

для образования пероксинитритов, результатом чего и является повышение окислительной модификации белков [49].

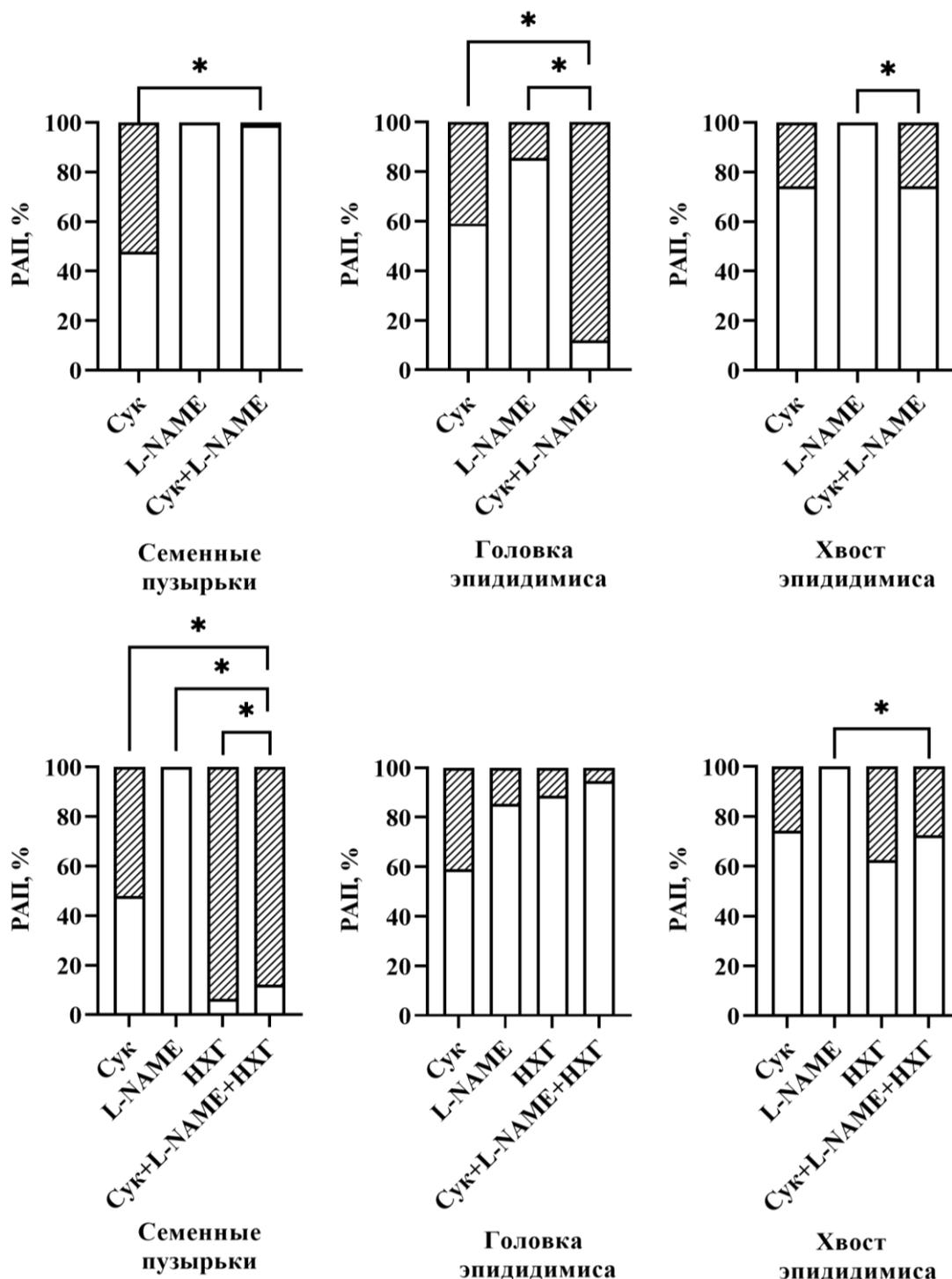


Рисунок 56 – Сравнение изменения резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий (РАП) при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината

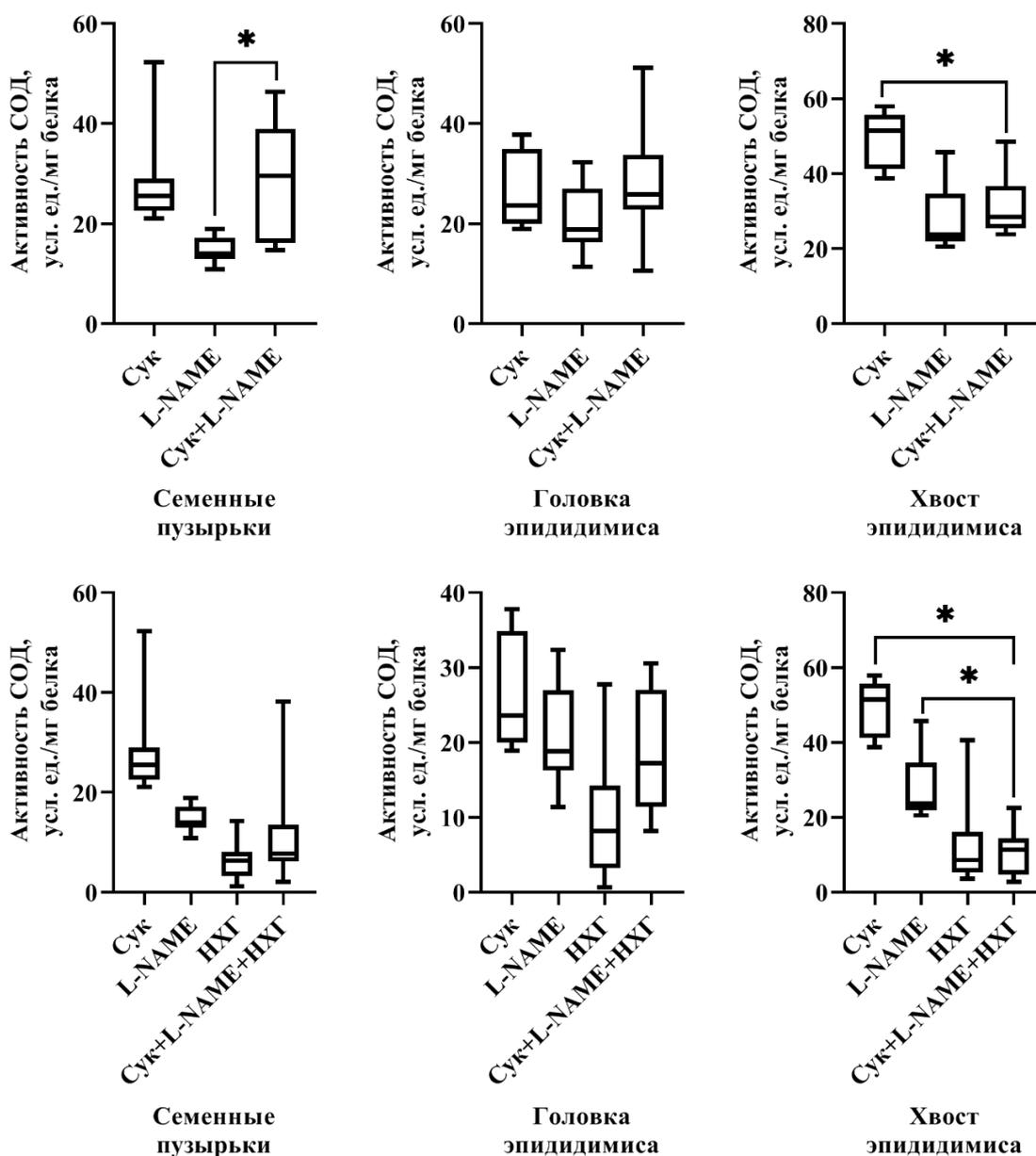


Рисунок 57 – Активность супероксиддисмутазы при моделировании НХГ, L-NAME-опосредованного дефицита NO и при назначении сукцината

Как отмечалось ранее, снижение РАП в условиях дефицита оксида азота (II) может быть связано с недостаточностью образования комплексов металл-NO. Повышение РАП при применении сукцината совместно с L-NAME также свидетельствует о способности сукцината пролонгировать существование оксида азота (II).

### 3.7.3. Изменение степени карбонилирования белков при назначении сукцината и L-аргинина

При курсовом назначении сукцината и L-аргинина отмечалось повышение уровня ОМБ в семенных пузырьках и хвосте эпидидимиса, но достоверные изменения в головке придатка яичка наблюдались только для КДФГнейт (Таблица 23). При этом в условиях моделирования НХГ комбинация препаратов способствовала снижению ОМБ митохондрий эпидидимиса относительно состояния только гипоксии, а в семенных пузырьках наблюдалось повышение показателя относительно серии животных, получавших только L-аргинин (Таблица 23).

Таблица 23 – Площади под кривой спектра поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов производных аминокислот в белках митохондрий семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и назначении L-аргинина и сукцината, в у.е./мг белка

Группы	САДФГ нейт	САДФГ осн	СКДФГ нейт	СКДФГ осн	Собщ
<b>Семенные пузырьки</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	16,48 [13,64; 18,14]	2,87 [2,68; 3,38]	4,24 [3,38; 4,48]	0,44 [0,39; 0,53]	24,76 [20,08; 26,08]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	15,13 [13,13; 16,3]	2,95 [2,4; 3,44]	3,65 [3,12; 4,23]	0,52 [0,45; 0,59]	22,24 [19,09; 24,59]
<b>Группа 10: Сук</b>	6,96 [3,87; 8,16]	1,1 [1,06; 2,22]	1,93 [1,31; 8,69]	0,19 [0,15; 0,3]	11,09 [6,37; 13,61]
<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	23,33 [16,83; 41,28] p <sub>8-14</sub> =0,067 p <sub>10-14</sub> = 0,0014*↑	14,57 [8,53; 18,04] p <sub>8-14</sub> = 0,007*↑ p <sub>10-14</sub> = 0,0014*↑	6,75 [3,97; 14,35] p <sub>8-14</sub> =0,067 p <sub>10-14</sub> = 0,005*↑	3,17 [1,74; 3,97] p <sub>8-14</sub> =0,014*↑ p <sub>10-14</sub> = 0,0019*↑	43,14 [31,93; 77,15] p <sub>8-14</sub> =0,007*↑ p <sub>10-14</sub> = 0,0009*↑
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	14,49 [11,79; 20,37] p <sub>4-15</sub> =0,79 p <sub>8-15</sub> =0,96 p <sub>10-15</sub> = 0,007*↑	3,32 [2,67; 4,84] p <sub>4-15</sub> =0,56 p <sub>8-15</sub> =0,49 p <sub>10-15</sub> =0,052	3,63 [3,14; 5,97] p <sub>4-15</sub> =0,96 p <sub>8-15</sub> =0,71 p <sub>10-15</sub> = 0,0054*↑	0,57 [0,43; 0,77] p <sub>4-15</sub> =0,49 p <sub>8-15</sub> =0,64 p <sub>10-15</sub> =0,031	22,01 [16,26; 32,34] p <sub>4-15</sub> =0,79 p <sub>8-15</sub> =0,96 p <sub>10-15</sub> = 0,007*↑
<b>Головка эпидидимиса</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	295,2 [228,97; 336,5]	8,77 [6,27; 10,62]	11,86 [7,36; 12,64]	1,46 [1,07; 1,85]	319,12 [241; 363,6]

Продолжение Таблицы 23

<b>Группа 8: L-Арг</b>	15,85 [12,67; 18,41]	3,04 [2,16; 3,77]	3,98 [3,27; 4,59]	0,39 [0,32; 0,49]	24,49 [17,62; 26,76]
<b>Группа 10: Сук</b>	12,94 [11,09; 16,23]	2,53 [2,42; 3,43]	3,51 [3,7; 3,63]	0,35 [0,28; 0,56]	19,31 [16,97; 24,14]
<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	18,69 [12,17; 22,83] p <sub>8-14</sub> =0,71 p <sub>10-14</sub> =0,49	2,95 [2,75; 3,37] p <sub>8-14</sub> =0,64 p <sub>10-14</sub> =0,43	4,81 [4,24; 5,35] p <sub>8-14</sub> =0,1 p <sub>10-14</sub> =0,01*↑	0,4 [0,37; 0,5] p <sub>8-14</sub> =0,96 p <sub>10-14</sub> =0,64	26,85 [20,1; 31,32] p <sub>8-14</sub> =0,43 p <sub>10-14</sub> =0,37
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	119,3 [114,2; 129,6] p <sub>4-15</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-15</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-15</sub> = 0,0009*↑	0,23 [0,1; 1,74] p <sub>4-15</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-15</sub> =0,014 p <sub>10-15</sub> =0,031	0,43 [0,25; 1,78] p <sub>4-15</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-15</sub> = 0,0014*↓ p <sub>10-15</sub> = 0,0019*↓	0,02 [0,002; 0,27] p <sub>4-15</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-15</sub> =0,031 p <sub>10-15</sub> =0,031	119,86 [115,9; 134,2] p <sub>4-15</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-15</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-15</sub> = 0,0009*↑
<b>Хвост эпидидимиса</b>					
<b>Группа 4: НХГ</b>	28,84 [24,19; 30]	5,16 [4,9; 6,09]	6,46 [6,09; 7,03]	0,849 [0,71; 0,9]	41,28 [36,4; 43,57]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	10,15 [9,49; 10,91]	1,48 [1,3; 1,64]	2,17 [1,82; 2,43]	0,21 [0,17; 0,25]	14,24 [13,3; 14,76]
<b>Группа 10: Сук</b>	11,48 [10,46; 12,88]	3,63 [3,44; 4,06]	4,66 [4,24; 5,06]	0,57 [0,49; 0,61]	20,09 [19,16; 22,48]
<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	17,44 [16,87; 18,5] p <sub>8-14</sub> = 0,014*↑ p <sub>10-14</sub> = 0,005*↑	3,37 [3,13; 3,53] p <sub>8-14</sub> = 0,014*↑ p <sub>10-14</sub> =0,37	4,23 [4,03; 4,67] p <sub>8-14</sub> =0,014*↑ p <sub>10-14</sub> =0,43	0,59 [0,5; 0,63] p <sub>8-14</sub> =0,004*↑ p <sub>10-14</sub> =0,64	25,78 [24,82; 26,72] p <sub>8-14</sub> =0,014*↑ p <sub>10-14</sub> =0,03
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	16,54 [14,73; 20,96] p <sub>4-15</sub> = 0,004*↓ p <sub>8-15</sub> =0,031 p <sub>10-15</sub> =0,031	3,27 [2,76; 4,14] p <sub>4-15</sub> = 0,003*↓ p <sub>8-15</sub> =0,014 p <sub>10-15</sub> =0,49	3,63 [2,74; 4,19] p <sub>4-15</sub> = 0,0019*↓ p <sub>8-15</sub> =0,083 p <sub>10-15</sub> =0,031	0,52 [0,43; 0,69] p <sub>4-15</sub> =0,01 p <sub>8-15</sub> =0,005*↑ p <sub>10-15</sub> =0,87	23,95 [20,04; 30,04] p <sub>4-15</sub> =0,003*↓ p <sub>8-15</sub> =0,031 p <sub>10-15</sub> =0,19

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргинина; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты

Повышение ОМБ в хвосте эпидидимиса у животных серии Сук+L-Арг сопровождалось снижением РАП, а в семенных пузырьках сочетание Сук+L-Арг+НХГ приводило к повышению этого показателя (Рисунок 58). В результатах исследования отмечалось понижение активности СОД в семенных пузырьках в группе Сук+L-Арг и в хвосте эпидидимиса в группе Сук+L-Арг+НХГ относительно животных, получавших только сукцинат (Рисунок 59).

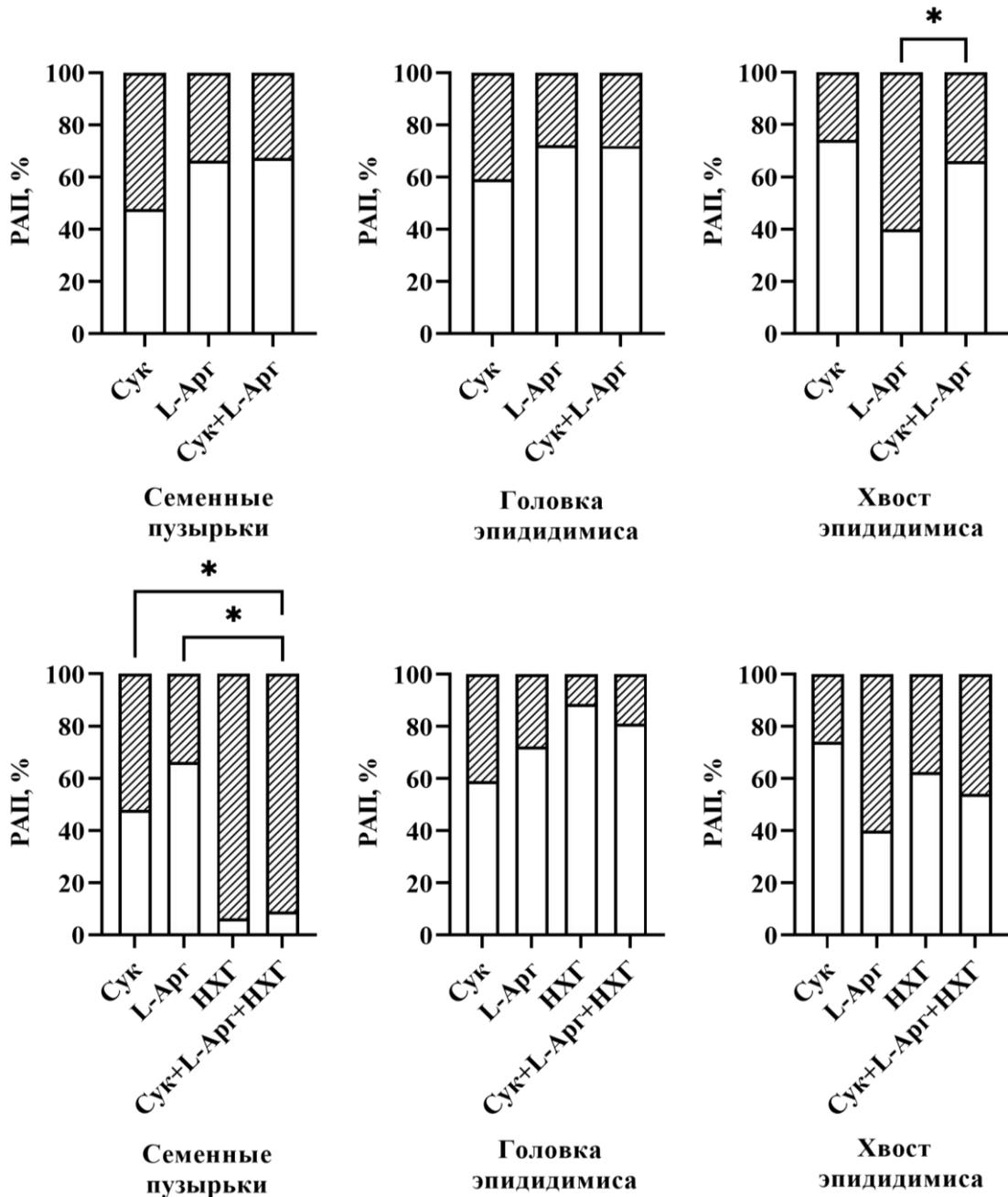


Рисунок 58 – Сравнение изменения резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков митохондрий (РАП) при моделировании NHG и назначении L-аргинина и сукцината

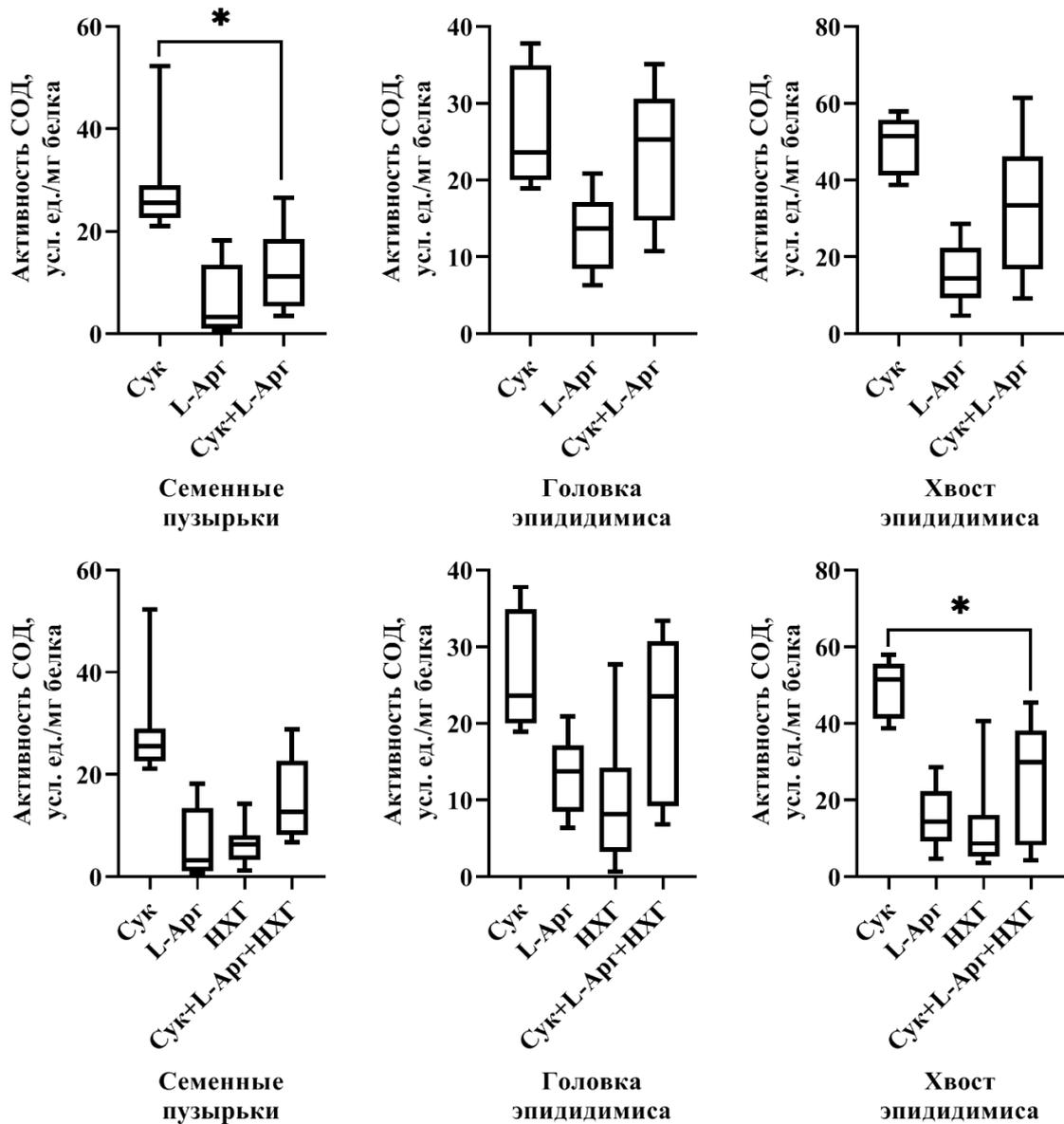


Рисунок 59 – Активность супероксиддисмутазы при моделировании НХГ и назначении L-аргинина и сукцината

Вероятно, снижение продукции оксида азота (II) в условиях гипоксии, обусловленное замедлением фосфорилирования синтазы оксида азота (II) и дефицитом кислорода, как одного из субстратов для синтеза, имитирует состояние экспериментального дефицита NO [85], при этом стимуляция NOS сукцинатом приводит к переключению работы фермента на продукцию АФК, что в совокупности со снижением активности СОД вследствие её усиленного в условиях гипоксии сукцинирования [197, 249] может служить объяснением повышения окислительного стресса. Применение L-аргинина совместно с сукцинатом и на фоне гипоксии направлено на регуляцию активности NOS и

смещения образования продуктов реакции в сторону NO [203, 265], а не АФК, что, в свою очередь, способствует подавлению активности фермента, а значит, уменьшению вероятности образования АФК и/или АФА. В результате степень карбонилирования белков значительно ниже, чем при действии ингибитора синтеза NO или при гипоксии, что подтверждается данными нашего исследования.

### **3.8. АНАЛИЗ ЗАВИСИМОСТИ УРОВНЯ ГОНАДОСТЕРОИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ, БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА И МАРКЕРОВ СЕКРЕТА СЕМЕННЫХ ПУЗЫРЬКОВ И ЭПИДИДИМИСА**

#### **3.8.1. Изменение уровня гонадостероидов в плазме крови и биохимических маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса**

Среди выделенных нами биохимических маркеров, отражающих функционирование мужской половой системы, в условиях гипоксии изменялась только активность  $\alpha$ -глюкозидазы хвоста эпидидимиса: повышение относительно группы контроля, а в головке придатка яичка в условиях экспериментального дефицита NO отмечалось снижение активности фермента (Таблица 24).

Таблица 24 – Содержание гонадостероидов крови и биохимических маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ сочетано с L-NAME-опосредованным дефицитом NO

Показатели	Плазма крови		Секрет семенных пузырьков Фруктоза, мг/мг белка	ЦФ эпидидимиса	
	Тестостерон, нмоль/л	Эстрадиол, пг/мл		головка	хвост
Группы	$\alpha$ -глюкозидаза, у.е./мг белка				
Группа 3: NO	28,95 [27,16; 52,83]	848,4 [803,8; 876,4]	3,82 [0,8; 6,68]	2,99 [2,04; 3,67]	3,01 [2,34; 3,35]
Группа 4: НХГ	20,01 [7,74; 35,89] p <sub>3-4</sub> =0,23	843,5 [776,2; 885,2] p <sub>3-4</sub> =0,87	7,68 [4,74; 11,14] p <sub>3-4</sub> =0,1	2,54 [2,33; 2,9] p <sub>3-4</sub> =0,56	4,62 [3,9; 5,13] p <sub>3-4</sub> =0,0039*↑

Продолжение Таблицы 24

<b>Группа 5: NaCl</b>	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]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	45,23 [16,6; 52,7] p <sub>5-6</sub> =0,1	877,2 [800,3; 889,8] p <sub>5-6</sub> =0,43	9,1 [8,09; 10,91] p <sub>5-6</sub> =0,23	2,11 [1,37; 2,68] p <sub>5-6</sub> =0,04*↓	3,54 [3,18; 4,02] p <sub>5-6</sub> =0,56
<b>Группа 7: L-NAME +НХГ</b>	16,57 [12,87; 19,19] p <sub>4-7</sub> =0,96 p <sub>6-7</sub> =0,1	795,7 [711,8; 858,2] p <sub>4-7</sub> =0,49 p <sub>6-7</sub> =0,008	10,2 [9,04; 14,47] p <sub>4-7</sub> =0,43 p <sub>6-7</sub> =0,43	2,17 [1,91; 2,46] p <sub>4-7</sub> =0,23 p <sub>6-7</sub> =0,64	3,54 [3,27; 4,5] p <sub>4-7</sub> =0,083 p <sub>6-7</sub> =0,79

Примечания – НО – нормоксия, контроль к группе 4; НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группе 6; L-NAME – животные, подвергшиеся моделированию дефицита оксида азота (II); ЦФ – цитоплазматическая фракция

Получение животными L-аргинина привело к уменьшению тестостерона плазмы крови и фруктозы секрета семенных пузырьков относительно группы контроля (Таблица 25).

Таблица 25 – Содержание гонадостероидов крови и биохимических маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и назначении L-аргинина

Показатели Группы	Плазма крови		Секрет семенных пузырьков Фруктоза, мг/мг белка	ЦФ эпидидимиса	
	Тестостерон, нмоль/л	Эстрадиол, пг/мл		головка	хвост
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 5: NaCl</b>	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]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	4,18 [2,42; 6,69] p <sub>5-8</sub> = 0,0039*↓	872,9 [805,7; 906,3] p <sub>5-8</sub> =0,32	1,96 [1,38; 2,67] p <sub>5-8</sub> = 0,0009*↓	3,18 [2,65; 4,02] p <sub>5-8</sub> =0,96	2,63 [2,45; 3,4] p <sub>5-8</sub> =0,96
<b>Группа 9: L-Арг+НХГ</b>	3,5 [2,83; 4,08] p <sub>4-9</sub> =0,005*↓ p <sub>8-9</sub> =0,71	782,7 [719,2; 899,6] p <sub>4-9</sub> =0,56 p <sub>8-9</sub> =0,64	7,91 [6,84; 16,42] p <sub>4-9</sub> =0,47 p <sub>8-9</sub> = 0,0009*↑	1,25 [0,6; 2,12] p <sub>4-9</sub> =0,018 p <sub>8-9</sub> = 0,0054*↓	7,14 [5,8; 7,75] p <sub>4-9</sub> =0,066 p <sub>8-9</sub> =0,0039*↑

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группе 8; L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргинина; ЦФ – цитоплазматическая фракция

Однако сочетание индукции синтеза NO и гипоксии сопровождалось снижением тестостерона относительно группы НХГ и α-глюкозидазы головки

эпидидимиса, но способствовало сохранению концентрации фруктозы на уровне контрольной группы и повышению  $\alpha$ -глюкозидазы хвоста придатка яичка (Таблица 25).

Назначение экзогенного сукцината вызвало снижение уровня эстрадиола и фруктозы, активности  $\alpha$ -глюкозидазы в проксимальном отделе эпидидимиса, но повышение активности фермента в дистальном отделе (Таблица 26). Сочетание Сук+НХГ характеризуется только снижением активности каудальной  $\alpha$ -глюкозидазы (Таблица 26).

Таблица 26 – Содержание гонадостероидов крови и биохимических маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и при назначении сукцината

Показатели Группы	Плазма крови		Секрет семенных пузырьков Фруктоза, мг/мг белка	ЦФ эпидидимиса	
	Тестостерон, нмоль/л	Эстрадиол, пг/мл		головка	хвост
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 5: NaCl</b>	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]
<b>Группа 10: Сук</b>	12,38 [5,77; 20,38] p <sub>5-10</sub> =0,43	792,6 [760,4; 807,5] p <sub>5-10</sub> = 0,0019*↓	4,4 [4,04; 4,69] p <sub>5-10</sub> = 0,0039*↓	1,65 [1,46; 1,93] p <sub>5-10</sub> = 0,0028*↓	6,33 [5,73; 8,16] p <sub>5-10</sub> =0,018*↑
<b>Группа 11: Сук+НХГ</b>	9,03 [3,18; 13,09] p <sub>4-11</sub> =0,32 p <sub>10-11</sub> =0,23	917,5 [628,2; 985,5] p <sub>4-11</sub> =0,6 p <sub>10-11</sub> =0,43	9,56 [7,77; 10,23] p <sub>4-11</sub> =0,031 p <sub>10-11</sub> =0,43	2,35 [1,91; 3,34] p <sub>4-11</sub> =0,71 p <sub>10-11</sub> =0,1	2,1 [1,32; 2,8] p <sub>4-11</sub> = 0,0009*↓ p <sub>10-11</sub> = 0,0009*↓

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; NaCl – животные, получавшие раствор хлорида натрия, контроль к группе 10; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты; ЦФ – цитоплазматическая фракция

Однако на фоне экспериментального дефицита NO и введения сукцината отмечались некоторые противоположные эффекты: снижение уровня тестостерона и фруктозы, активности  $\alpha$ -глюкозидазы хвоста придатка яичка, но повышение эстрадиола и  $\alpha$ -глюкозидазы головки эпидидимиса (Таблица 27).

При этом усложнение условий эксперимента гипоксией характеризовалось повышением активности фермента в дистальном отделе придатка яичка.

Сочетанное действие Сук+L-Арг сопровождалось повышением уровня эстрадиола и активности  $\alpha$ -глюкозидазы головки эпидидимиса, как отдельно, так и на фоне гипоксии; но содержание фруктозы и активность каудального фермента менялись разнонаправленно: увеличение при назначении только препаратов, но уменьшение при сочетании инъекций с моделированием гипоксии (Таблица 27).

Таблица 27 – Содержание гонадостероидов крови и биохимических маркеров секрета семенных пузырьков и эпидидимиса при моделировании НХГ и назначении сукцината в условиях изменённого синтеза оксида азота (II)

Показатели Группы	Плазма крови		Секрет семенных пузырьков Фруктоза, мг/мг белка	ЦФ эпидидимиса	
	Тестостерон, нмоль/л	Эстрадиол, пг/мл		головка	хвост
			$\alpha$ -глюкозидаза, у.е./мг белка		
<b>Группа 4: НХГ</b>	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]
<b>Группа 8: L-Арг</b>	4,18 [2,42; 6,69]	872,9 [805,7; 906,3]	1,96 [1,38; 2,67]	3,18 [2,65; 4,02]	2,63 [2,45; 3,4]
<b>Группа 6: L-NAME</b>	45,23 [16,6; 52,7]	877,2 [800,3; 889,8]	9,1 [8,09; 10,91]	2,11 [1,37; 2,68]	3,54 [3,18; 4,02]
<b>Группа 10: Сук</b>	12,38 [5,77; 20,38]	792,6 [760,4; 807,5]	4,4 [4,04; 4,69]	1,65 [1,46; 1,93]	6,33 [5,73; 8,16]
<b>Группа 12: Сук+ L-NAME</b>	3,4 [2,26; 4,5]  p <sub>6-12</sub> = 0,0039*↓  p <sub>10-12</sub> = 0,0028*↓	1001,6 [905,5; 1031,2]  p <sub>6-12</sub> =0,007*↑  p <sub>10-12</sub> = 0,0009*↑	5,93 [5,38; 6,12]  p <sub>6-12</sub> = 0,0009*↓  p <sub>10-12</sub> =0,04	5,03 [4,43; 6,14]  p <sub>6-12</sub> = 0,0009*↑  p <sub>10-12</sub> = 0,0009*↑	2,24 [1,83; 3,06]  p <sub>6-12</sub> =0,04  p <sub>10-12</sub> = 0,0009*↓
<b>Группа 13: Сук+ L-NAME+ НХГ</b>	4,41 [4,09; 5,65]  p <sub>4-13</sub> =0,02  p <sub>6-13</sub> =0,01  p <sub>10-13</sub> =0,01	864,5 [822,9; 963]  p <sub>4-13</sub> =0,43  p <sub>6-13</sub> =0,96  p <sub>10-13</sub> =0,1	5,43 [3,43; 6,57]  p <sub>4-13</sub> =0,16  p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↓  p <sub>10-13</sub> =0,37	2,25 [1,72; 2,57]  p <sub>4-13</sub> =0,19  p <sub>6-13</sub> =0,87  p <sub>10-13</sub> =0,27	9,04 [8,57; 9,82]  p <sub>4-13</sub> = 0,0009*↑  p <sub>6-13</sub> = 0,0009*↑  p <sub>10-13</sub> = 0,0074*↑

Продолжение Таблицы 27

<b>Группа 14: Сук+L-Арг</b>	4,99 [3,87; 8,37] p <sub>8-14</sub> =0,96 p <sub>10-14</sub> =0,041	991,3 [892,6; 1018,2] p <sub>8-14</sub> =0,052 p <sub>10-14</sub> = 0,0009*↑	7,8 [5,02; 22,65] p <sub>8-14</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-14</sub> =0,066	11,24 [3,68; 17,25] p <sub>8-14</sub> =0,083 p <sub>10-14</sub> = 0,0039*↑	4,56 [3,45; 6,1] p <sub>8-14</sub> =0,014*↑ p <sub>10-14</sub> =0,052
<b>Группа 15: Сук+L-Арг+ НХГ</b>	14,53 [11,9; 20,2] p <sub>4-15</sub> =0,71 p <sub>8-15</sub> =0,01 p <sub>10-15</sub> =0,71	1150,5 [1023,4; 1188,1] p <sub>4-15</sub> = 0,0009*↑ p <sub>8-15</sub> = 0,0009*↑ p <sub>10-15</sub> = 0,0009*↑	3,05 [2,52; 3,53] p <sub>4-15</sub> = 0,0009*↓ p <sub>8-15</sub> =0,066 p <sub>10-15</sub> =0,01	3,08 [2,97; 3,57] p <sub>4-15</sub> =0,03 p <sub>8-15</sub> =0,71 p <sub>10-15</sub> = 0,0009*↑	2,58 [2,23; 3,31] p <sub>4-15</sub> =0,04 p <sub>8-15</sub> =0,79 p <sub>10-15</sub> = 0,0039*↓

Примечания – НХГ – животные, подвергшиеся моделированию нормобарической хронической гипоксии; L-NAME – животные, подвергшиеся моделированию дефицита оксида азота (II); L-Арг – животные, получавшие раствор L-аргинина; Сук – животные, получавшие раствор янтарной кислоты; ЦФ – цитоплазматическая фракция

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 [174] и характеризует разработанный нами способ моделирования нормобарической хронической гипоксии, с одной стороны, как модель развития патогенеза, а с другой – как модель для изучения адаптационных стратегий при кислорододефиците. На изменение уровня тестостерона сильное влияние оказало сочетанное действие L-NAME и сукцината, спровоцировав достоверное снижение гормона по сравнению с обеими контрольными группами. Возможно, причиной таких изменений могла оказаться активация синтеза эстрадиола из тестостерона и смещение баланса этих гормонов, или индукция эстрадиолом синтеза в печени гормон-связывающего белка, обладающего более высоким сродством к тестостерону, что подтверждается резким повышением уровня эстрадиола в крови. Кроме того, именно эстрадиолу принадлежит роль регулятора выработки гонадотропных гормонов по механизму обратной отрицательной связи, что также приводит к снижению синтеза тестостерона. Получение животными L-аргинина, как отдельно, так и совместно с НХГ, вызывало такой же эффект.

Введение экзогенного L-аргинина спровоцировало повышение эстрадиола на фоне назначения инъекций сукцината относительно только сукцината, а также отмечался высокий уровень гормона при воздействии всех трёх факторов – гипоксии, сукцината и аргинина – относительно каждого контроля. Другими словами, получение животными L-аргинина резко изменяло соотношение эстрадиол/тестостерон.

Демонстрируемые данные согласуются с каноническими представлениями о регуляции синтеза гонадостероидов оксидом азота (II) [206] и показывают, что влияние экзогенного сукцината при изменённом синтезе оксида азота (II) может негативно отразиться на сперматогенезе.

Гонадостероиды имеют важное значение в регуляции антиоксидантной защиты клеток. Так, тотальное отсутствие тестостерона приводит к снижению эффективности АОС, однако сам гормон способствует активации митохондриального окисления и, как следствие, увеличению продукции АФК, снижая при этом активность СОД [237]. Также экспериментально подтверждён антиоксидантный эффект эстрадиола при гипоксии [137]. В совокупности данных можно заключить, что антигипоксические свойства L-аргинина, так же, как и эффекты сукцината при экспериментальном дефиците оксида азота (II), могут быть связаны с модуляцией синтеза этих гормонов.

В нашей работе продемонстрировано, что секреторная активность семенных пузырьков в большей степени зависит от уровня тестостерона, чем от уровня эстрадиола [43], а в головке эпидидимиса проявлялась большая зависимость от гонадостероидов, в частности, эстрадиола, чем в дистальном отделе органа.

### **3.8.2. Анализ результатов исследования и оценка силы корреляционной связи между показателями семенных пузырьков**

Для интерпретации результатов исследования тканей и плазмы крови мы провели оценку тесноты взаимосвязи между показателями с помощью ранговой корреляции Спирмена с использованием шкалы Чеддока. Отдельно проводили

анализ для данных, полученных в условиях моделирования нормобарической хронической гипоксии, её коррекции сукцинатом при экспериментальном дефиците NO (Рисунок 60), и данных, полученных в условиях моделирования нормобарической хронической гипоксии, её коррекции сукцинатом и индукции синтеза NO L-аргинином (Рисунок 61).

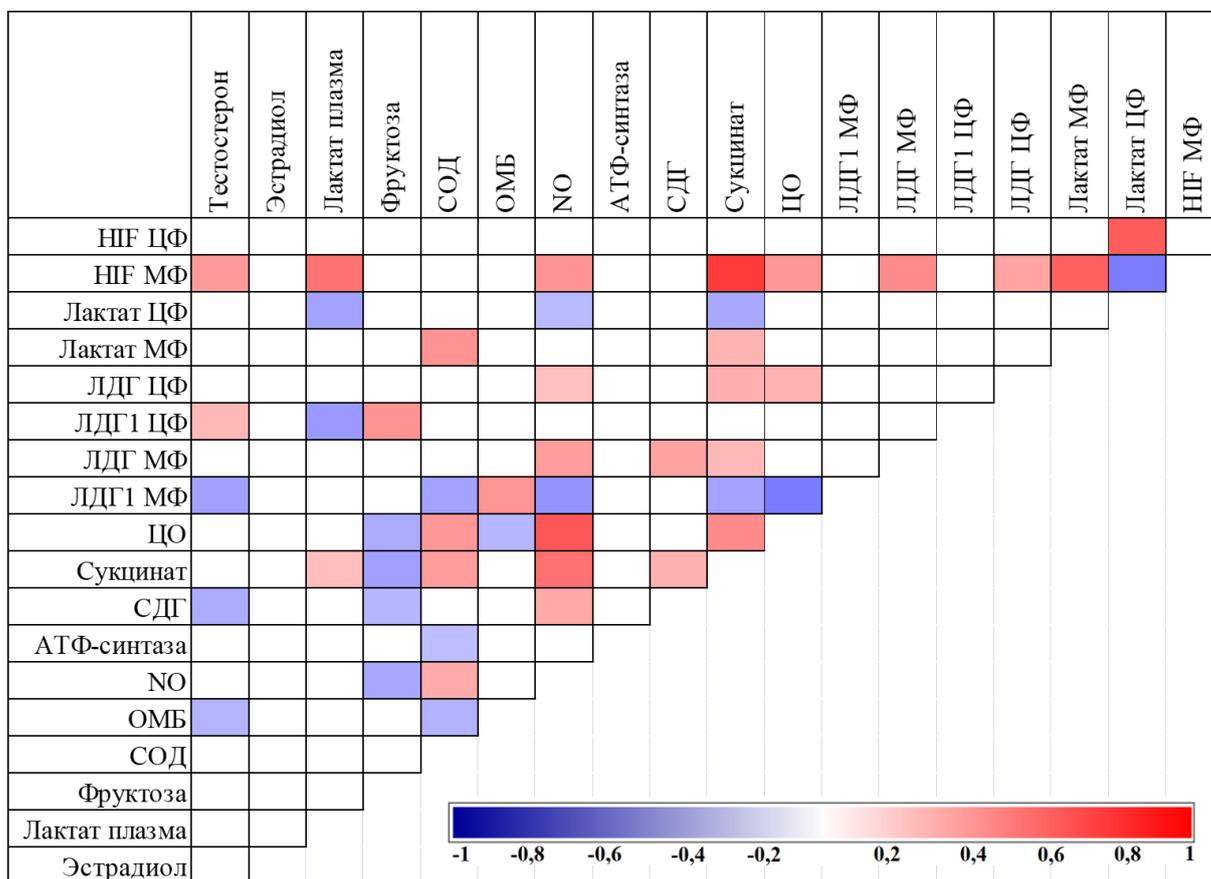


Рисунок 60 – Взаимосвязь показателей семенных пузырьков в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии и её коррекции сукцинатом на фоне экспериментального дефицита оксида азота (II)

Примечания – здесь и далее по тексту представлены данные, имеющие достоверные значения  $p < 0,05$ , исключены повторения: результаты отображены однократно; тесноту взаимосвязи между показателями оценивали по критерию ранговой корреляции Спирмена с использованием шкалы Чеддока

Секреторная функция семенных пузырьков регулируется гонадостероидами, что может объяснить снижение фруктозы при назначении животным сукцината или L-аргинина, где также отмечается понижение эстрадиола и тестостерона в плазме крови. Однако статистически значимой корреляции между этими показателями при модуляции синтеза оксида азота (II)

L-NAME или L-аргинином выявлено не было (Рисунок 60). Индукция метаболизма митохондрий тестостероном подтверждается положительной корреляцией между содержанием этого гормона в плазме крови и фактора, индуцируемого гипоксией, в митохондриальной фракции семенных пузырьков; обратная корреляция с ЛДГ1 МФ и прямая с ЛДГ1 ЦФ свидетельствует о снижении использования лактата в качестве энергетического субстрата, что согласуется с концепцией увеличения роли окислительного фосфорилирования под влиянием тестостерона. Также это положение подтверждается положительной корреляцией между HIF1 $\alpha$  МФ и лактатом плазмы, наблюдаемой в обоих случаях модуляции синтеза NO.

Увеличение концентрации молочной кислоты в цитоплазме, уменьшение её в митохондриях и плазме крови, увеличение активности ЛДГ1 ЦФ, а также отрицательная корреляция лактата ЦФ и HIF1 $\alpha$  МФ, но положительная с HIF1 $\alpha$  ЦФ приводит к выводу о том, что состояние гипоксии, моделируемое в нашем эксперименте, характеризуется кратковременным метаболическим переключением с окислительного на высокогликолитическое состояние. При этом, вероятно, клетка решает проблему накопления лактата не удалением его из цитоплазмы, а окислением в пируват, как только это становится возможным.

Секреторная способность семенных пузырьков, оцениваемая по содержанию фруктозы, повышается в условиях моделирования гипоксии и дефицита оксида азота (II) даже при снижении функции ферментов ЭТЦ. Результаты можно объяснить действием тестостерона, синтез которого в условиях дефицита NO усиливается [89].

Изменения активности СДГ, содержания сукцината и метаболитов NO и положительная корреляционная связь между этими показателями при моделировании гипоксии на фоне дефицита NO позволяют высказать предположение о нарушении реверсивной работы СДГ, наблюдаемой при ингибировании ЦО в обычных условиях. Наши выводы согласуются с исследованиями других авторов [97, 256, 258], что также даёт нам право

говорить о развитии окислительного стресса из-за нарушения продвижения электронов по ЭТЦ в условиях ингибирования NOS.

Инверсия работы СДГ позволяет направить поток электронов от комплекса I ЭТЦ через кофермент Q на фумарат с образованием сукцината, что можно рассматривать, как механизм, поддерживающий окислительную способность митохондрий в условиях гипоксии. Анализ изменения концентрации лактата, сукцината, активности ЛДГ и СДГ и их корреляционной взаимосвязи позволяет предположить, что нарушение функционирования комплекса I при ингибировании реверсивной работы СДГ в условиях дефицита NO и гипоксии способствует накоплению НАДН+H<sup>+</sup>.

Снижение общей активности ЛДГ и повышение при этом ЛДГ1 МФ препятствует окислению НАД в реакции восстановления пирувата. Описанные события отражаются на работе челночных механизмов и способствуют увеличению молочной кислоты в цитоплазме, где также невозможно её превращение в пируват из-за снижения процентного содержания ЛДГ1. Таким образом, единственным путём утилизации лактата становится его отток из цитоплазмы, что увеличивает количество молочной кислоты в крови.

Противоположные эффекты наблюдаются в группах животных, получавших L-аргинин (Рисунок 61). Таким образом, возникает идея направленного потока электронов от восстановленного НАД в цитоплазме через лактатный шунт и ферменты ЭТЦ к сукцинату, накопление и выход из митохондрий которого запускает механизм приспособления к гипоксии путём активации HIF1 $\alpha$  и SUCNR1, но только в условиях достаточного снабжения оксидом азота (II).

Назначение экзогенного L-аргинина в дозировке 500 мг/кг массы тела животного вызывало ещё более выраженные изменения в количестве HIF1 $\alpha$ , молочной кислоты, сукцината, активности ЦО и СОД, что говорит о его гипоксия-подобном эффекте.

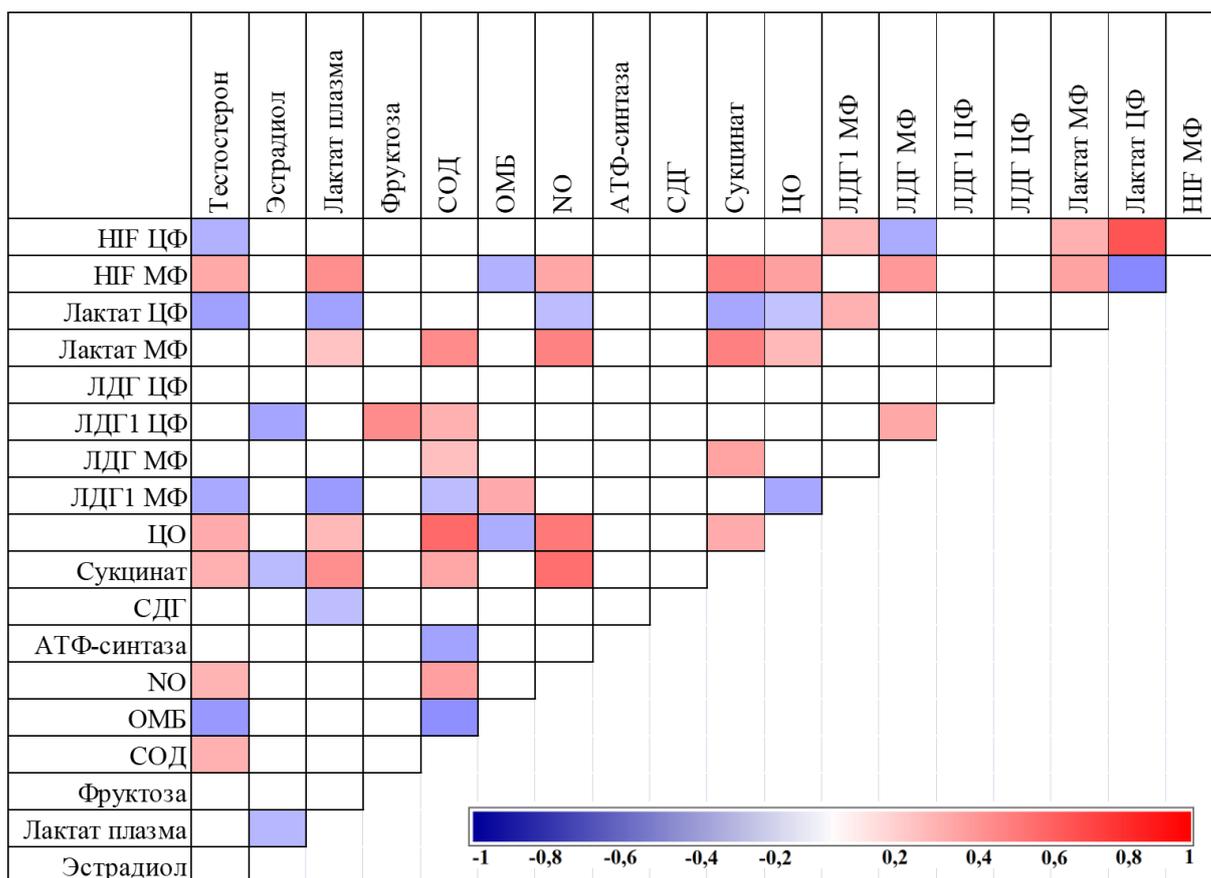


Рисунок 61 – Взаимосвязь показателей семенных пузырьков в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии и её коррекции сукцинатом на фоне получения животными экзогенного L-аргинина

Рассматривая L-аргинин, как предшественник оксида азота (II), можно сделать вывод, что состояние псевдогипоксии вызвано кислороднезависимой активацией HIF [143, 251, 283]. Приводя к снижению HIF1 $\alpha$ , ассоциированного с митохондриями, и накоплению этого фактора в цитоплазме, L-аргинин способствует повышению его транскрипционной активности [140]. В свою очередь, HIF1 $\alpha$  тормозит биогенез и активность митохондрий, что необходимо для ограничения продукции АФК и снижения риска развития окислительного стресса [200].

Вероятно, хроническая гипоксия, которая в нашем эксперименте была представлена ежедневными циклами гипоксия/реоксигенация и имела характер интермиттирующей (перемежающей), оказывала кратковременное влияние на стабилизацию HIF, а проявление эффектов L-аргинина не было ограничено по времени, что и привело к перераспределению этого белка между

субклеточными фракциями. Корреляционная связь между показателями HIF1 $\alpha$ , лактатом и активностью ЛДГ характеризует состояние клетки при получении животными экзогенного L-аргинина, как более приспособленное к кислорододефициту (Рисунок 61).

Снижение активности ЦО при гипоксии может быть обусловлено ингибирующим действием оксида азота (II), что также объясняет уменьшение количества его метаболитов в митохондриях семенных пузырьков.

Активность СОД также может регулироваться оксидом азота (II) [272]. СОД2 в активном центре содержит ионы марганца (Mn<sup>2+</sup>), которые могут замещаться ионами железа (Fe<sup>2+</sup>), что меняет эффекты СОД2 с анти- на прооксидантные. Такая замена является мощным фактором развития окислительного стресса. Мы предполагаем, что благодаря способности NO обратимо образовывать нитрозильные комплексы с железом, тем самым ограничивая его биодоступность, СОД2 в присутствии оксида азота (II) прочнее сохраняет свою связь с Mn<sup>2+</sup>, а, следовательно, антиоксидантную функцию. Положительная корреляция между содержанием метаболитов NO и активностью СОД как в экспериментах по моделированию дефицита оксида азота (II), так и в экспериментах с назначением L-аргинина, подтверждают нашу теорию. Степень окислительного повреждения белков митохондрий семенных пузырьков повышается в условиях гипоксии и при модуляции синтеза NO.

Отмечается положительная корреляционная связь между уровнем сукцината и лактата митохондрий независимо от условий снабжения оксидом азота (II) (Рисунки 60, 61), что подтверждает вывод о транспорте сукцината в виде монокарбоксилата в условиях лактоацидоза. Экзогенный сукцинат проявляет антиоксидантные свойства только при НХГ, но в сочетании с L-NAME или с L-Арг является прооксидантом. Положительный эффект сукцината при гипоксии может быть связан и как с активацией HIF1 $\alpha$ , так и с эффектом сукцината, реализуемым через рецептор SUCNR1. Однако при получении животными L-аргинина снижения ОМБ не наблюдается, что

указывает на механизм антиоксидантного влияния сукцината, сопряжённый именно с его гормоноподобной функцией. Поскольку известно, что активация рецептора сукцината приводит к повышению экспрессии NOS, можно заключить, что эффекты этого метаболита реализуются посредством оксида азота (II). Изменение РАП подтверждают идею об адаптационном характере моделируемой гипоксии и участии оксида азота в качестве антиоксиданта.

### **3.8.3. Анализ результатов исследования и оценка силы корреляционной связи между показателями головки эпидидимиса**

По результатам анализа показателей головки придатка яичка можно заключить, что секреторная способность, определяемая по активности  $\alpha$ -глюкозидазы, регулируется эстрадиолом, о чём свидетельствует положительная корреляция между этими показателями как при моделировании дефицита оксида азота (II) (Рисунок 62), так и при модуляции синтеза NO L-аргинином (Рисунок 63). Отмечается тенденция понижения активности секреторного фермента при увеличении HIF1 $\alpha$  ЦФ, что ещё раз подчёркивает участие эстрадиола в регуляции экспрессии HIF [137] и  $\alpha$ -глюкозидазы.

Как ранее было отмечено для семенных пузырьков, действие тестостерона усиливало окислительную способность митохондрий, уменьшало использование лактата в качестве энергетического субстрата, таким образом, обе ткани вносили вклад в повышение количества лактата в плазме крови, особенно при получении животными L-NAME. Кроме того, положительная корреляция между содержанием тестостерона в плазме крови и ЛДГх в митохондриях в условиях дефицита NO свидетельствует об участии тестостерона в повышении экспрессии этого, специфичного для сперматозоидов, белка.

Отмечено незначительное повышение ОМБ при назначении сукцината, но сочетание НХГ+Сук, при котором степень ОМБ значительно ниже, чем при гипоксии, свидетельствует в пользу подтверждения антигипоксантных эффектов сукцината. Поскольку при назначении сукцината отмечается

повышение ОМБ и снижение РАП, но в серии Сук+L-NAME наблюдается резкое увеличение РАП, можно говорить не только о протективном эффекте сукцината в условиях дефицита оксида азота (II), но и о невозможности реализации некоторых его эффектов в условиях сниженного синтеза NO.

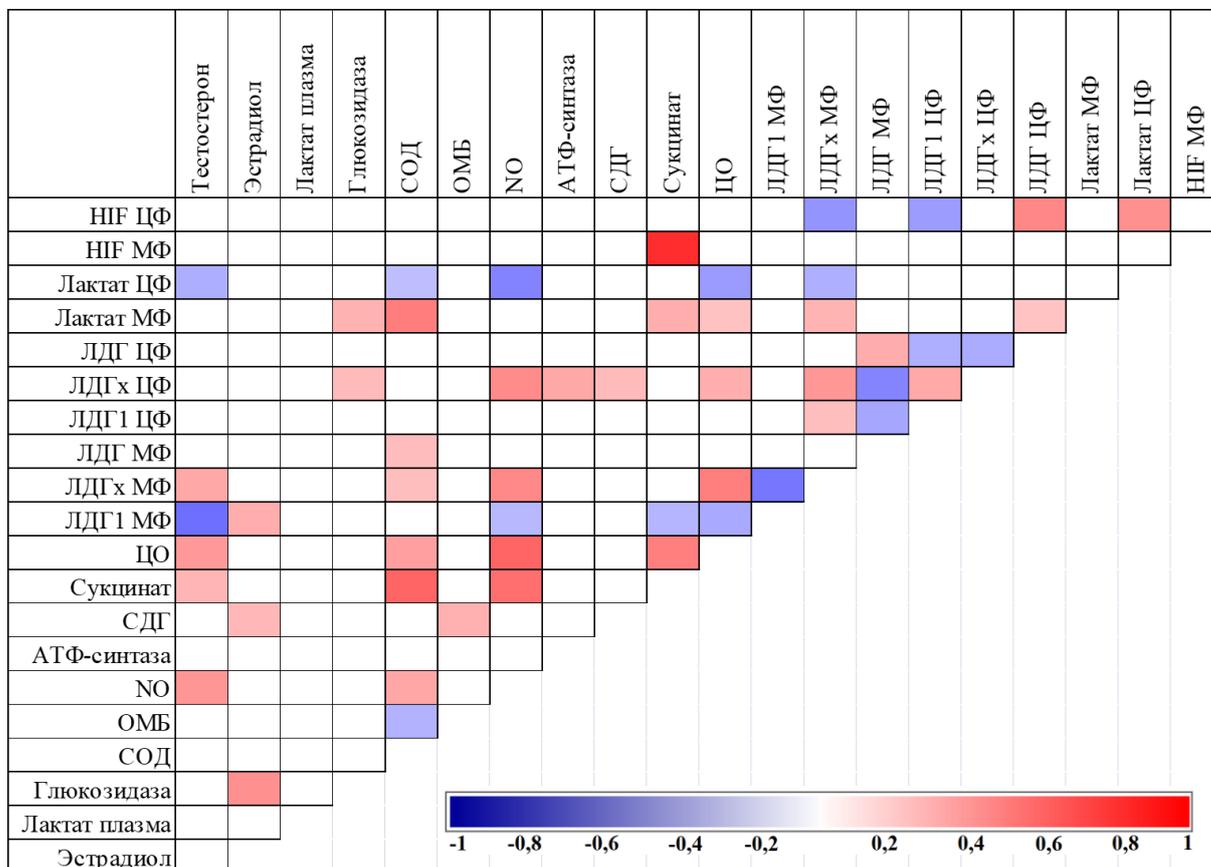


Рисунок 62 – Взаимосвязь показателей головки эпидидимиса в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии и её коррекции сукцинатом на фоне экспериментального дефицита оксида азота (II)

При назначении животным экзогенного L-аргинина на фоне гипоксии отмечается уникальная особенность – повышение HIF1 $\alpha$  в обеих субклеточных фракциях, что подтверждается положительной корреляцией между этими параметрами. Вероятно, ускоренный синтез NO в условиях получения животными инъекций L-аргинином, активирует HIF, который, в свою очередь, снижает экспрессию ASS, а, следовательно, и эндогенный синтез этой аминокислоты и NO соответственно. Этим можно объяснить низкий уровень метаболитов NO в митохондриях, который зафиксирован у животных, получавших L-аргинин.

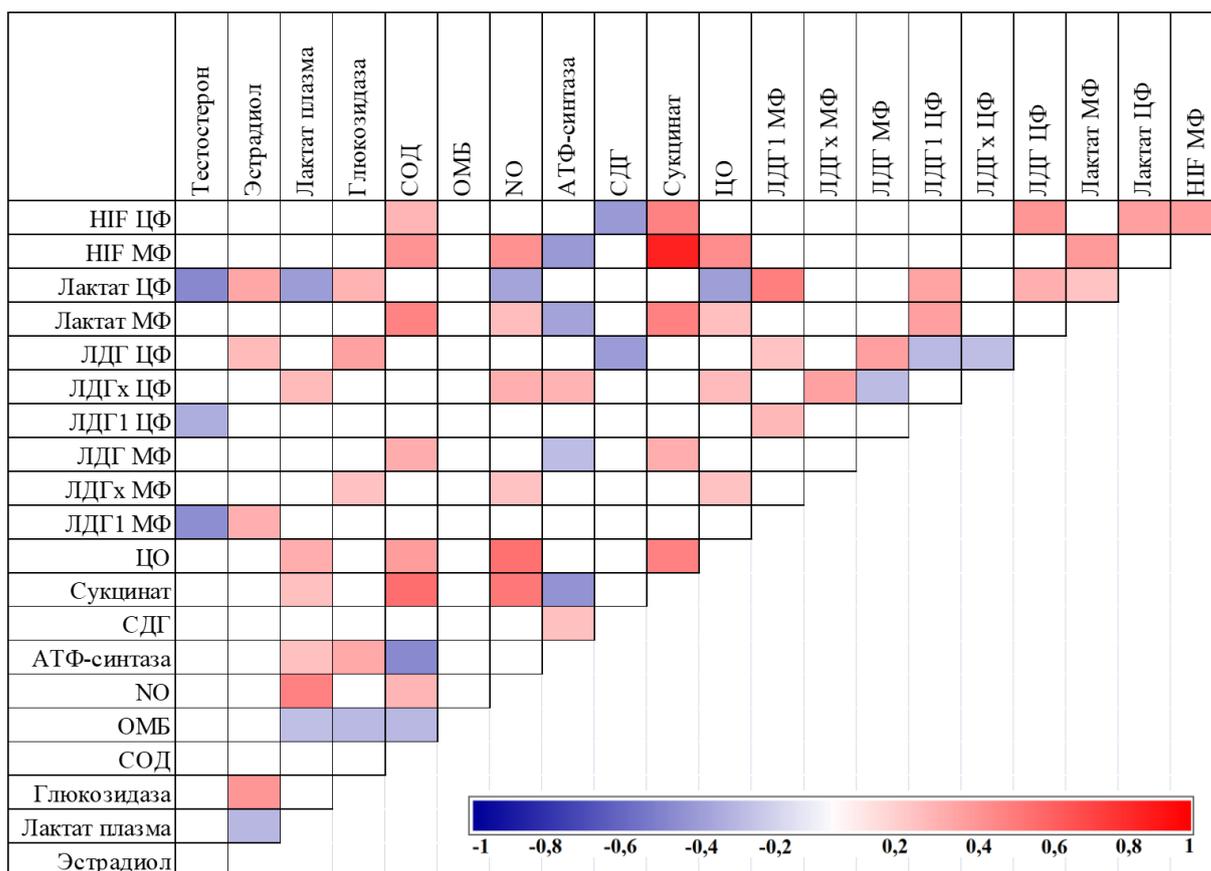


Рисунок 63 – Взаимосвязь показателей головки эпидидимиса в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии и её коррекции сукцинатом на фоне получения животными экзогенного L-аргинина

Основываясь на полученных данных, можно заключить, что в головке эпидидимиса L-аргинин, так же, как и в семенных пузырьках, проявлял гипоксия-подобный эффект. Отмеченная ранее тенденция соответствия лактата и ЦО подтверждается корреляцией средней силы (Рисунок 63). Однако не все изменения исследуемых показателей совпадают между собой в сравниваемых тканях. Возможно, повышение  $\text{HIF1}\alpha$ , ассоциированного с митохондриями, приводит к снижению его транскрипционной активности и увеличению потенциала митохондрий, что выражается в виде сохранения активности ЦО и накоплении сукцината, наблюдаемые в головке придатка яичка. Таким образом, расширяется понимание антиоксидантной функции L-аргинина при нормобарической гипоксии.

Активность СОД митохондрий головки эпидидимиса при гипоксии ниже, чем в условиях нормального снабжения кислородом, но при назначении

сукцината или L-аргинина в условиях НХГ показатель стабилизируется. Отмечается такая же корреляционная связь между СОД и NO, как и в семенных пузырьках. НХГ характеризуется резким увеличением окислительного повреждения белков митохондрий головки придатка яичка.

Отрицательная корреляция между активностью СОД и степенью ОМБ служит доказательством участия этого фермента в антиоксидантной защите, как белков семенных пузырьков, так и белков головки эпидидимиса. Кроме того, в условиях НХГ и экспериментального дефицита NO в головке придатка яичка наблюдается положительная корреляция между ОМБ и СДГ. Это позволяет предположить, что нарушение регуляции СДГ оксидом азота (II) приводит к повышению прооксидантных эффектов фермента.

#### **3.8.4. Анализ результатов исследования и оценка силы корреляционной связи между показателями хвоста эпидидимиса**

Положительная корреляция эстрадиола плазмы и ЛДГ1 МФ, а также отрицательная с лактатом в условиях дефицита NO, понижение количества сукцината при увеличении активности СДГ, свидетельствуют о том, что снижение функции тестостерона и повышение эстрадиола вызывает переключение пути утилизации восстановленных коферментов с окислительного фосфорилирования на восстановление пирувата, что сопровождается накоплением лактата (Рисунок 64).

Активность  $\alpha$ -глюкозидазы в условиях нормоксии в головке и хвосте эпидидимиса не имеет достоверных отличий. Однако в хвосте придатка яичка, в отличие от головки, при НХГ наблюдалось повышение этого показателя. Противоположные изменения отмечались при получении животными сукцината, при сочетанном влиянии Сук+L-NAME+НХГ и L-Арг+НХГ, что явно свидетельствует о метаболических различиях этих частей органа.

Анализ результатов содержания молочной кислоты и активности ЛДГ и её изоформ, а также отрицательная корреляционная связь между ЛДГх и

лактатом в цитоплазматической фракции свидетельствуют об усилении роли лактата в качестве энергетического субстрата при НХГ и при дефиците NO.

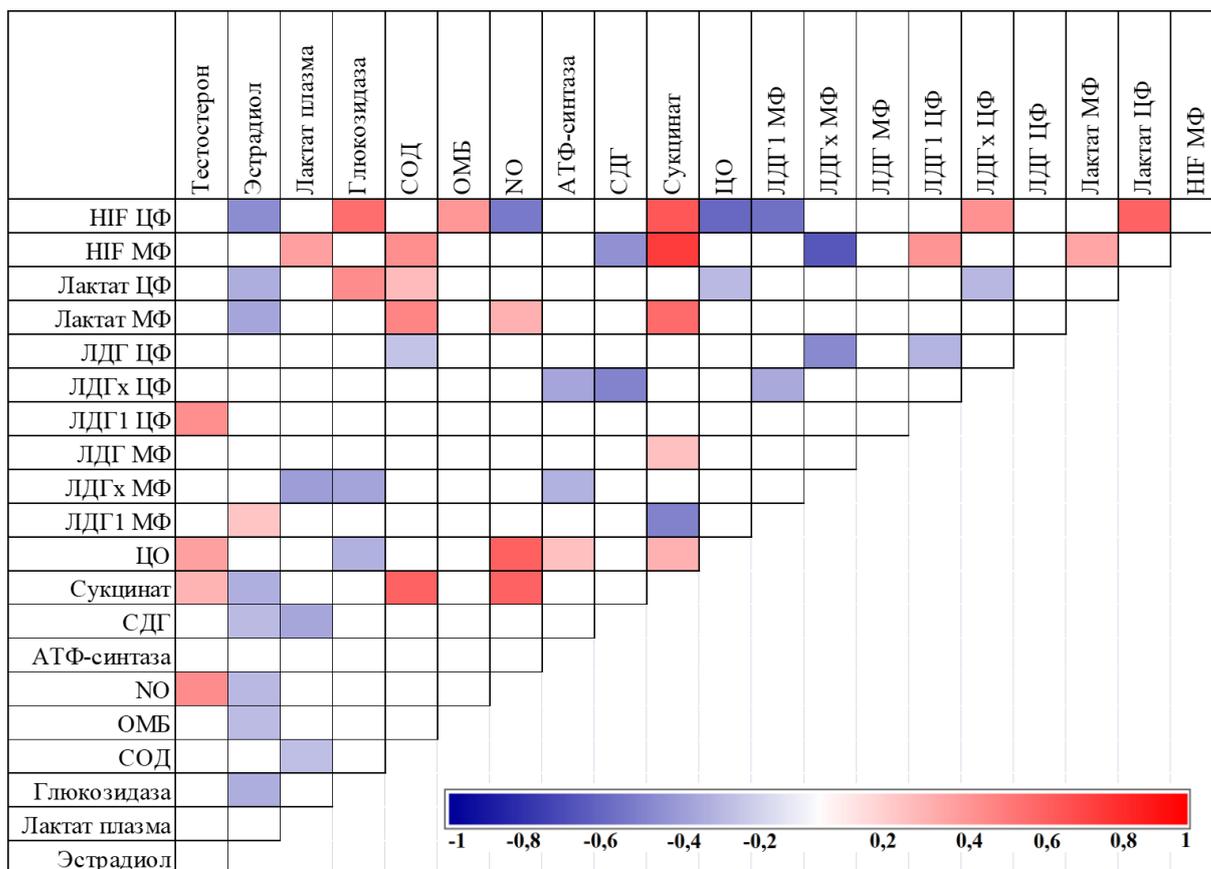


Рисунок 64 – Взаимосвязь показателей хвоста эпидидимиса в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии и её коррекции сукцинатом на фоне экспериментального дефицита оксида азота (II)

Повышение общей ОМБ у животных, которым был назначен L-NAME, резкое снижение РАП и обратная корреляционная связь с эстрадиолом подтверждают теорию о негативном окислительном стрессе, развивающемся при дефиците оксида азота (II).

В результатах исследования замечена тенденция повышения Н1F1 $\alpha$  в эпидидимисе на фоне снижения уровня эстрадиола плазмы при введении сукцината. Однако обратная корреляция между этими показателями достоверна только в дистальном отделе придатка яичка. Полученные данные дополняют результаты других исследователей, установивших подобную закономерность в эксперименте с гипоксией [137].

В экспериментах с животными, которым был назначен экзогенный L-аргинин, получены противоположные данные (Рисунок 65). Возможно, инъекции L-аргинина посредством NO вызвали снижение продукции тестостерона, что, в свою очередь, стало причиной угнетения продукции АФК митохондриями и снижения необходимости восстанавливать пируват для уравнивания окислительно-восстановительного статуса клетки.

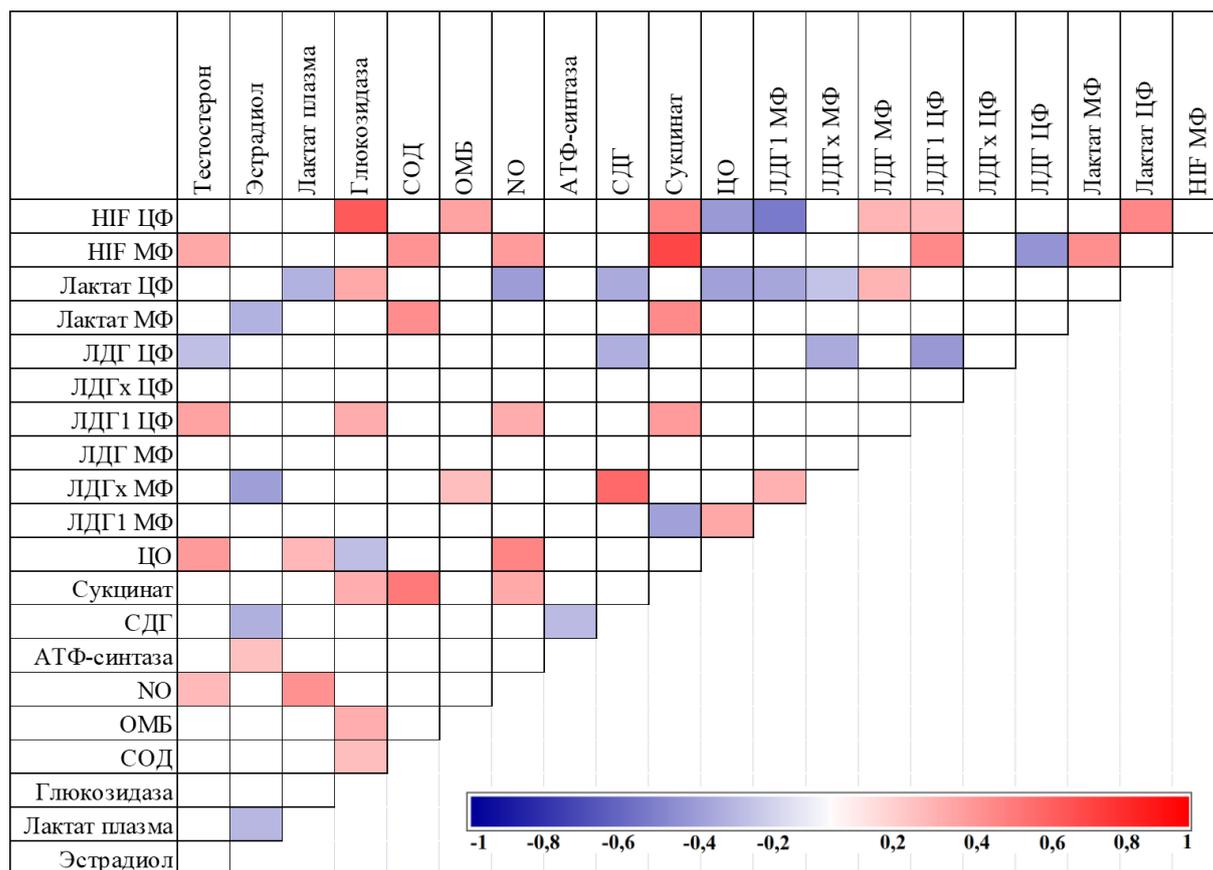


Рисунок 65 – Взаимосвязь показателей хвоста эпидидимиса в экспериментах по моделированию нормобарической хронической гипоксии её коррекции сукцинатом на фоне получения животными экзогенного L-аргинина

Продуцирующийся каудальным отделом эпидидимиса белковый фактор покоя, ингибирующий NOS и, как следствие, подвижность сперматозоидов [83], имеет диапазон активности при pH от 6,5 до 8. Возможно, отрицательная корреляция между метаболитами NO и лактатом ЦФ в условиях модуляции синтеза оксида азота (II) L-аргинином отражает способность клеток регулировать pH с помощью окислительно-восстановительных реакций для уравнивания активации и ингибирования NOS посредством изменения

кинетики белкового фактора покоя. Изменяющаяся активность ЛДГ1 ЦФ служит подтверждением предположения о взаимной регуляции реакций окисления и количества NO.

Как и для описанных ранее семенных пузырьков и головки эпидидимиса, в хвосте придатка яичка L-аргинин проявлял гипоксия-подобный эффект. Причём активность ЦО в серии L-Арг+НХГ снижалась относительно НХГ. Возможно, активность фермента в данном случае изменялась как вследствие увеличения экспрессии COX4I2 под влиянием HIF, так и вследствие ингибирования активного центра оксидом азота (II).

Положительная корреляция между активностью ЦО, содержанием метаболитов NO и количеством сукцината в экспериментах по моделированию гипоксии на фоне дефицита оксида азота (II), а также уменьшение уровня сукцината свидетельствует о нарушении работы ЭТЦ, следствием чего может стать гиперпродукция АФК. Однако при получении животными L-аргинина наблюдается повышение концентрации сукцината, что может быть маркёром реверсивной работы СДГ, и признаком эффективности антиоксидантной системы.

Активность СОД в митохондриях хвоста эпидидимиса, в отличие от других тканей, не имеет корреляционной связи с содержанием метаболитов NO. Однако корреляция с уровнем сукцината прослеживается для всех сравниваемых серий экспериментов. Это согласуется с нашими рассуждениями о возможности использования такого параметра, как сукцинат, в качестве оценки окислительно-восстановительного статуса клетки.

Анализируя степень ОМБ в митохондриях хвоста эпидидимиса, стоит отметить кумулятивный эффект повышения показателя при назначении L-аргинина совместно с сукцинатом или на фоне НХГ. При этом наблюдается положительная корреляция с HIF1 $\alpha$  ЦФ, ЛДГх МФ и  $\alpha$ -глюкозидазой, а РАП статистически не отличается от условий нормоксии, что даёт нам повод сделать предположение о сигнальном характере окислительного стресса, который не приводит к функциональным нарушениям белков.

## ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Влияние дефицита кислорода на метаболизм клеток разнообразно и многогранно. Успех адаптации к гипоксии обусловлен множеством факторов: метаболическим профилем клетки, от чего зависит экспрессия митохондриальных ферментов, пути использования кислорода и энергии самой клеткой; микроокружением и способностью клетки обмениваться биологически активными веществами с окружающей её средой; необходимостью поддерживать жизнеобеспечение клетки и полноценное функционирование. 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. Для воссоздания условий гипоксии мы использовали гермокамеру с подключённым анализатором газов и собственную запатентованную впоследствии методику проведения эксперимента [50, 62]; для моделирования активации синтеза или дефицита NO использовали естественный субстрат NOS – L-аргинин и его структурный аналог – неселективный ингибитор NOS L-нитроаргинин метил эфир (L-NAME) соответственно.

Разработанный нами способ моделирования нормобарической хронической гипоксии является физиологически адекватным, так как воспроизводит циклические эпизоды кислорододефицита, например, такие как при апноэ, или временное нарушение достаточного снабжения кислородом с последующей реоксигенацией, как в случае нахождения в непроветриваемых помещениях, характеризуется как модель для изучения адаптационных стратегий при кислорододефиците, и в меньшей степени, как модель развития патогенеза. При гипоксических тренировках 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 янтарной кислоты длительность эксперимента по моделированию НХГ увеличивалась: животные дольше находились в камере к 14 дню эксперимента, по сравнению с первым, что напрямую подтверждает антигипоксанта́нный 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.

Известно, что в условиях, когда эффективность работы ЭТЦ снижена, пируват превращается в лактат, чтобы обеспечить утилизацию НАДН [95]. Таким образом, накопление молочной кислоты может быть показателем переключения метаболизма клеток с аэробного на анаэробный тип, когда низкая эффективность работы электрон-транспортной цепи компенсируется высокой скоростью гликолиза. Вопреки ожидаемому, нам не удалось установить повышение лактата плазмы крови при моделировании кислорододефицита. Вероятно, в исследуемых условиях лактат преимущественно сохраняется клеткой для дальнейшего использования при реоксигенации. Кроме того, известно, что ацидоз, то есть накопление протонов, способствует последующему использованию  $H^+$  для синтеза АТФ, повышая коэффициент P/O [84]. Возможно, лактат транспортирует протоны, перенося их через анионселективный канал митохондрий в межмембранное пространство, таким образом, поддерживая протонный потенциал для синтеза АТФ даже в отсутствие кислорода. Полученные нами данные об увеличении доли ЛДГ1 МФ и уменьшение ЛДГ1 ЦФ могут свидетельствовать о повышении роли лактата в качестве энергетического субстрата и усилении лактатного шунта в условиях гипоксии и изменённого синтеза NO.

Экспрессия ЛДГ напрямую зависит от возможности использования глюкозы в качестве энергетического субстрата [20]. В нашем исследовании установлено влияние оксида азота (II) на изменение изоферментного спектра лактатдегидрогеназы: 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. Таким образом, применение L-аргинина при патологиях, сопровождающихся депривацией кислорода, может благоприятствовать улучшению восстановления тканей мужской репродуктивной системы.

Однако длительное воздействие L-аргинина снижает продукцию оксида азота (II). Вероятно, высокие значения NO, что является следствием инъекций L-аргинином, активируют HIF, который, в свою очередь, снижает экспрессию ASS, уравновешивая тем самым продукцию эндогенной аминокислоты и NO соответственно. L-аргинин вследствие активации HIF вызывает состояние псевдогипоксии, другими словами, обладает гипоксия-подобным эффектом, что в нашем исследовании подтверждается сменой метаболического профиля митохондрий с аэробного на анаэробный даже в состоянии нормоксии. Приводя к снижению HIF1 $\alpha$ , ассоциированного с митохондриями, и накоплению этого фактора в цитоплазме, L-аргинин способствует повышению его транскрипционной активности. Кроме того, HIF1 $\alpha$  тормозит биогенез и активность митохондрий, что необходимо для ограничения продукции АФК и снижения риска развития окислительного стресса, а высокий уровень нормоксической экспрессии HIF1 $\alpha$  служит критерием устойчивости к кислорододефициту [80]. В экспериментах с клеточными культурами даны сведения о действии NO на HIF [143, 251, 283], мы подтвердили *in vivo* гипоксия-подобный эффект донора оксида азота (II) L-аргинина. Возможно, этим и обусловлены антиоксидантные свойства данной аминокислоты.

Отличия в накоплении HIF1 $\alpha$  в головке и хвосте эпидидимиса указывают на фундаментальные различия в том, как проксимальные и дистальные области придатка яичка регулируют гомеостаз кислорода. Кроме того, 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 изменения этого показателя во втором. Низкая активность лактатдегидрогеназы и малое количество молочной кислоты в головке эпидидимиса можно трактовать так, что превращение пирувата в лактат в условиях кислорододефицита заторможено, что приводит к накоплению второго продукта этой реакции – восстановленного НАД. Последний, вероятно, стимулирует работу дыхательной цепи, что при сниженной активности цитохромоксидазы приводит к формированию большого количества активных форм кислорода. А это уже является фактором повышения окислительного повреждения белков.

В литературе описывается прямая зависимость между уровнем тестостерона и массой дополнительных половых органов грызунов: яичек, семенных пузырьков, простаты; а также количеством цитрата и фруктозы, продуцируемой семенными пузырьками [138]. В нашем исследовании установлено снижение продукции тестостерона при получении животными инъекций L-аргинина, что, в свою очередь, является причиной задержки развития репродуктивной функции тканей и выражается понижением уровня фруктозы в семенных пузырьках. Установлена зависимость активности  $\alpha$ -глюкозидазы эпидидимиса от уровня эстрадиола плазмы крови, что может послужить дополнительным диагностическим критерием для оценки обструкции протоков придатка яичка и его секреторной способности. Кроме того, повышенная чувствительность головки эпидидимиса к эстрадиолу может служить объяснением различия в экспрессии некоторых белков, например, HIF, так как описано, что эстрадиол понижает скорость синтеза этого фактора [137].

Сукцинат в качестве антигипоксанта проявил себя как антиоксидант только в условиях физиологического синтеза NO, что

выражалось в снижении окислительной модификации белков и стабилизации активности мембранно-связанных ферментов митохондрий, а также повышении активности супероксиддисмутазы – фермента антиоксидантной системы защиты клетки. Полученные данные позволяют характеризовать уровень сукцината в митохондриях как показатель эффективности антиоксидантной защиты клеток.

При моделировании дефицита оксида азота (II) путём неселективного ингибирования NOS или при индукции его синтеза L-аргинином эффекты янтарной кислоты в большей степени характеризуются как прооксидантные. Стоит отметить, что 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 формировании адаптации к кислорододефициту: при моделировании дефицита NO концентрация сукцината снижается, а в присутствие 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 поддержание стабильной работы электрон-транспортной цепи в условиях кислорододефицита. Однако назначение при этом янтарной кислоты, как отдельно, так и в сочетании с гипоксией, способствовало возвращению активности СДГ на прежний уровень.

Эффекты экзогенного сукцината распространяются и на регуляцию гликолиза. Так, 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.

Кроме участия в регуляции метаболизма клеток сукцинат оказывает влияние и на стероидогенез, снижая уровень эстрадиола плазмы крови, что нашло своё отражение и в снижении активности  $\alpha$ -глюкозидазы головки эпидидимиса. С другой стороны, активность фермента регулируется транскрипционным фактором HIF, который, в свою очередь, в присутствии сукцината меньше подвергается деградации. Так, в хвосте эпидидимиса при назначении экзогенной янтарной кислоты соотношение HIF1 $\alpha$  МФ / ЦФ резко снижено, что указывает на усиление транскрипционных эффектов HIF, в связи с чем в этой экспериментальной группе наблюдается повышение активности  $\alpha$ -глюкозидазы дистального отдела придатка яичка. Таким образом, одни и те же функции разных отделов органа могут контролироваться уникальными путями, что связано с отличием метаболических профилей этих тканей.

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.

## ГЛАВА 5. 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 супероксиддисмутаза 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 супероксиддисмутаза 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 $\alpha$  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  $\alpha$ -глюкозидазы на 254% ( $p=0,0039$ ) в головке эпидидимиса, при этом применение янтарной кислоты в качестве антигипоксанта ассоциировано с повышением уровня эстрадиола плазмы крови на 36% ( $p=0,0009$ ) и снижением количества фруктозы секрета семенных пузырьков на 60% ( $p=0,0009$ ).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Изменения показателей активности ключевых митохондриальных ферментов, произошедшие в тканях под влиянием нормобарической хронической гипоксии, имеют высокий уровень значимости, что свидетельствует о происходящей адаптации к условиям гипоксии на клеточном и субклеточном уровнях и позволяет рассматривать данную методику в качестве экспериментальной модели для дальнейшего использования в исследованиях. Разработанная модель нормобарической гипоксии может быть использована другими исследователями для изучения молекулярных основ нарушений, возникающих при гипоксии, адаптации к ней, влияния антигипоксантов и поиска новых лекарственных средств для лечения и профилактики патологических состояний, в том числе мужского бесплодия, а также для совершенствования вспомогательных репродуктивных технологий.

Выявленные в нашем исследовании антиоксидантные и антигипоксантные свойства L-аргинина и сукцината у самцов крыс позволяют уточнить механизм действия этих препаратов на организм. Их использование для улучшения репродуктивной функции мужчин обосновано снижением продукции активных форм кислорода и окислительных процессов при созревании сперматозоидов при сохранении скорости синтеза АТФ, что способствует корректному созреванию половых клеток и более длительному сохранению. Однако для оценки эффективности и целесообразности назначения препаратов, содержащих указанные метаболиты, в качестве биологической добавки для улучшения репродуктивной функции мужчин необходимо провести соответствующие клинические исследования. В частности, установленная закономерность снижения уровня тестостерона плазмы крови при назначении L-аргинина может служить научным обоснованием к персонализации назначения терапии, включающей эту аминокислоту, в зависимости от исходного уровня гормона у пациента.

Обнаруженная прямая корреляционная зависимость между уровнем эстрадиола плазмы крови и активностью  $\alpha$ -глюкозидазы эпидидимиса может быть использована в медицинской практике для более точной интерпретации анализа крови и эякулята с целью установления проходимости протоков придатка яичка и его секреторной способности. Так как на сегодняшний день оценка активности фермента проводится лишь с целью установить проходимость путей придатка яичка для созревающих сперматозоидов, пренебрегая возможностью изменения экспрессии этого белка.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В нашей работе были использованы метаболиты и антиметаболиты в виде химических субстанций (растворы янтарной кислоты, метилового эфира N( $\omega$ )-нитро-L-аргинина и L-аргинина), что, несомненно, оправдано целью исследования получить данные о влиянии непосредственно самих химических веществ. Однако нами не изучались эффекты лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище, в виде которых данные соединения могут применяться в медицинской практике, что может послужить предпосылкой для дальнейшего исследования данной проблематики.

Будущим исследователям стоит обратить внимание на другие доноры оксида азота (II), такие как S-нитрозоглутатион, и возможные ингибиторы NOS, в том числе селективные, а также на иные клеточные метаболиты, участвующие в регуляции функционирования митохондрий при гипоксии.

Модель эксперимента, воспроизведённая нами, предполагала введение препаратов параллельно с гипоксическими тренировками. Однако остаётся невыясненным, каким образом повлияет на адаптацию к кислорододефициту лечение препаратами, предваряющее воздействие гипоксии.

Выявленный эффект снижения тестостерона плазмы крови у животных, получавших L-аргинин, открывает вопрос о целесообразности применения данного вещества для улучшения репродуктивной функции, так как низкий уровень гормона может негативно сказаться на развитии половых желёз и сперматогенезе. С другой стороны, нами были подтверждены положительные эффекты L-аргинина на клеточный метаболизм при воздействии гипоксии, что не исключает использование аминокислоты в терапевтических целях. Противоречивый характер полученных данных ставит новые вопросы и перспективы для будущих исследователей: повлияет ли введение L-аргинина на синтез гонадостероидов при исходно низком уровне гормона; изменяется ли оплодотворяющая способность сперматозоидов, и, следовательно, мужская фертильность, в условиях введения экзогенного L-аргинина; возможна ли

коррекция низкого уровня тестостерона путём введения экзогенного гормона при назначении L-аргинина и каким эффектом будет обладать комбинированная терапия при гипоксии.

В нашем исследовании установлен антиоксидантный эффект сукцината в условиях физиологического синтеза оксида азота (II), при этом в условиях дефицита NO отмечалось повышение окислительной модификации белков. Возможно, сукцинат в условиях снижения продукции NO ингибирует сукцинил-КоА-синтетазу, или обращает работу фермента, что вызывает накопление сукцинил-КоА и избыточное сукцинирование белков, являющихся в этом случае потенциальными мишенями для окислительной модификации. Это предположение ещё предстоит проверить будущими исследованиями.

Таким образом, наша работа, отвечая на поставленные задачи, открывает новые точки обзора, и сама по себе может стать предпосылкой для ряда будущих исследований.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразон

L-Арг – L-аргинин

АДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразоны альдегидных производных  
аминокислот

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

КДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразоны кетоновых производных  
аминокислот

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МФ – митохондриальная фракция

НО – нормоксия

НОГ – нормобарическая острая гипоксия

НХГ – хроническая нормобарическая 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

ASS – argininosuccinate synthetase, аргининосукцинатсинтетаза

eNOS – endothelial NO-synthase, эндотелиальная синтаза оксида азота (II)

HIF – hypoxia-inducible factor, фактор, индуцируемый гипоксией

iNOS – inducible NO-synthase, индуцибельная синтаза оксида азота (II)

LDH – lactate dehydrogenase, лактатдегидрогеназа

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

MCT – monocarboxylate transporter, транспортёр монокарбоксилата

mtNOS – mitochondrial NO-synthase, митохондриальная синтаза оксида азота (II)

nNOS – neuronal NO-synthase, нейрональная синтаза оксида азота (II)

NOS – NO-synthase, NO-синтаза, синтаза оксида азота (II)

PHD – prolyl hydroxylase domain, пролилгидроксилаза

SCS – succinyl coenzyme A synthetase, сукцинил-КоА-синтетаза

SUCNR1 – succinate receptor 1, сукцинатный рецептор 1

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абросимов, В.Н. Оценка функциональных показателей дыхательной системы у пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких при проведении 6-минутного шагового теста / В.Н. Абросимов, Н.Н. Перегудова, А.В. Косяков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2019. – Т. 7, № 3. – С. 323-331.

2. Адаптация к гипоксии и гипероксии повышает физическую выносливость: роль активных форм кислорода и редокс сигнализации / Т.Г. Сазонтова, О.С. Глазачев, А.В. Болотова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2012. – Т. 98, № 6. – С. 793-807.

3. Арапова, А.И. Аутокаталитические эффекты лизосомальных цистеиновых протеиназ гладкой мышцы аорты крыс / А.И. Арапова, М.А. Фомина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2015. – № 4. – С. 27-32.

4. Березов, Т.Т. Полиамины: их роль в норме и при патологии центральной нервной системы / Т.Т. Березов, М.Г. Маклецова, Т.Н. Федорова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2012. – Т. 6, № 2. – С. 38-42.

5. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов : учебное пособие : [для студентов, обучающихся по специальности 06.01.12 - "Медицинская биохимия" / Д. И. Кузьменко, Т. В. Жаворонок, И. П. Мамонтова и др.] ; Сибирский гос. медицинский университет ; под ред. В. Ю. Сереброва, Г. А. Сухановой. – [Учеб. изд.]. – Томск : Сибирский государственный медицинский университет, 2008. – 179 с. – Текст (визуальный) : непосредственный

6. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа / К.Б. Шумаев, Н.Э. Петрова, И.В. Заббарова [и др.]. – Текст

(визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 5. – С. 699-705.

7. Влияние комплексов железа с оксидом азота на реакционную способность цистеинов гемоглобина / О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина, К.Б. Шумаев [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 5. – С. 436-445.

8. Влияние полисахаридов тыквы на активность некоторых ферментов митохондрий клеток добавочных половых желёз самцов крыс в условиях острой гипоксии с гиперкапнией / А. А. Карасева, Р. Р. Казимова, И. Д. Аверьянов [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием "Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции", Рязань, 11–12 апреля 2019 года / Под ред. О.В. Баковецкой. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2019. – С. 78-80.

9. Влияние полисахаридов тыквы на показатели окислительного стресса при острой гипоксии с гиперкапнией у крыс / Ю. А. Марсянова, Е. А. Лаксаева, И. А. Кяримов, В. И. Звягина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, № 2. – С. 31-36.

10. Влияние экзогенного L-аргинина на уровень карбонилирования белков митохондрий головки и хвоста эпидидимиса крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии / В. И. Звягина, Э. С. Бельских, Ю. А. Марсянова, С. Р. Ахмедова – Текст (визуальный) : непосредственный // 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. 32-36.

11. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на экспрессию NF- $\kappa$ B в головном мозге крыс / П. Ю. Мыльников, Е. Н. Якушева, И. В. Черных, А.

В. Шулькин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Материалы Всероссийской научной конференции молодых учёных, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина "Достижения современной фармакологической науки", Рязань, 08–10 ноября 2018 года / Под ред. Е.Н. Якушевой. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2018. – С. 80-81.

12. Воронков, А.В. Влияние новых производных пиримидин-4-она на показатели ауторегуляции мозгового кровообращения и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга крыс на фоне хронической гемической гипоксии / А.В. Воронков, А.С. Лысенко, А.Ф. Бандура. – Текст (визуальный) : непосредственный // Анализ риска здоровью. – 2018. – № 1. – С. 98-103.

13. Галагудза, М. М. Индуцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень противовоспалительной терапии: надежда не потеряна? / М. М. Галагудза, Ю. П. Бельский, Н. В. Бельская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2023. – Т. 38, № 1. – С. 13-20.

14. Гиперкапния – альтернативный гипоксии сигнальный стимул для повышения HIF-1 $\alpha$  и эритропоэтина в головном мозге / В.П. Куликов, П.П. Трегуб, П.Д. Ковзелев [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – Т. 59, № 3. – С. 34-37.

15. Гипоксия-зависимый контроль активности врождённого антимикробного иммунитета у пациентов с кариесом дентина / О.А. Зорина, О.А. Борискина, А.А. Басова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Стоматология. – 2019. – Т. 98, №5. – С. 60-65.

16. ГОСТ Р ИСО 5479-2002. Статистические методы. Проверка отклонения распределения вероятностей от нормального распределения = Statistical methods. Tests for departure of the probability distribution from the normal distribution: национальный стандарт РФ: издание официальное:

утвержден и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 22 января 2002 г.: введен впервые: 01.07.2002 / разработан АО "Научно-исследовательский центр контроля и диагностики технических систем". (АО "НИЦ КД"). – Москва, 2002. – 34 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

17. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств: Монография / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. – М.: Вузовская книга, 2004. – 360 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

18. Гривенникова, В.Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями / В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 245-296.

19. Диоксины и окислительно-восстановительный статус эякулята: есть ли связь с фертильностью? / С.Ш. Галимова, А.Ф. Гайсина, О.Ю. Травников, Э.Ф. Галимова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука молодых – Eruditio Juvenium. – 2018. – № 2. – С. 259-266.

20. Епринцев, А.Т. Уровни экспрессии и активность изоферментов лактатдегидрогеназы печени крыс при аллоксановом диабете / А.Т. Епринцев, И.Р. Бондарева, Н.В. Селиванова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2022. – Т. 68, № 1. – С. 32-38.

21. Зарубина, И.В. Современные представления о патогенезе гипоксии и ее фармакологической коррекции / И.В. Зарубина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 31-48.

22. Звягина, В. И. Изменения биохимических показателей в митохондриях эпидидимиса крыс при экспериментальном снижении синтеза NO (II) / В. И. Звягина, Э. С. Бельских, Д. В. Медведев – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева : материалы Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием, Рязань, 04–06

февраля 2016 года. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, 2016. – С. 25-30.

23. Звягина, В. И. Изучение воздействия неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME на функциональное состояние митохондрий эпидидимиса крыс / В. И. Звягина, Э. С. Бельских – Текст (визуальный) : непосредственный // Материалы ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвященной 65-летию работы университета на Рязанской земле, Рязань, 18 декабря 2015 года. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, 2015. – С. 249-251.

24. Звягина, В. И. Изучение протективного эффекта карнитина хлорида на активность митохондриальных оксидоредуктаз эпидидимиса крыс в условиях L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции / В. И. Звягина, Э. С. Бельских – Текст (визуальный) : непосредственный // Перспективы внедрения инновационных технологий в фармации : Сборник материалов Международной научно-практической конференции, Орехово-Зуево, 25 ноября 2014 года / Под общей редакцией Ханиной М.А., ответственный редактор Киселева В.А.. – Орехово-Зуево: Московский государственный областной гуманитарный институт, 2014. – С. 15.

25. Звягина, В. И. Карнитина хлорид снижает степень выраженности экспериментальной гипергомоцистеинемии и способствует утилизации лактата митохондриальной фракцией эпидидимиса крыс / В. И. Звягина, Э. С. Бельских. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2021. – Т. 67, № 4. – С. 338-346.

26. Звягина, В. И. Сравнительная оценка функциональной активности митохондрий эпидидимиса крыс при окислительном стрессе, опосредованном гипергомоцистеинемией и введением L-NAME / В. И. Звягина, Э. С. Бельских – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58, № 2. – С. 126-140.

27. Изменение показателей окислительного стресса при моделировании дефицита синтеза оксида азота (II) в митохондриях ткани лёгких у крыс / Д. В. Медведев, В. И. Звягина, О. М. Урясьев [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Земский врач. – 2017. – № 1. – С. 34-37.

28. Изучение влияния сукцината на некоторые показатели антиоксидантной системы защиты организма / И. А. Кяримов, Ю. А. Марсянова, В. Д. Шевченко [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биофармацевтический журнал. – 2021. – Т. 13, № 2. – С. 3-6.

29. Изучение остеопротективного действия L-аргинина, L-норвалина и розувастатина на модели гипоэстроген-индуцированного остеопороза у крыс / О.С. Гудырев, А.В. Файтельсон, М.С. Соболев [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2019. – Т. 27, № 3. – С. 325-332.

30. Изучение функционального состояния митохондрий придатка яичка крыс в условиях изменения синтеза оксида азота (II) / В.И. Звягина, Э.С. Бельских, Д.В. Медведев, Н.А. Головач. – Текст (визуальный) : непосредственный // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, № 5. – С. 814-818.

31. Исследование компонентов NIF-1a-сигнального пути в плазме крови у пациентов с COVID-19 инфекцией различной степени тяжести / С. Н. Райцев, В. И. Звягина, Э. С. Бельских [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2024. – Т. 27, № 4. – С. 57-62.

32. Исследование окислительного стресса и функции митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных с хроническим бронхитом и с хронической обструктивной болезнью лёгких / Э.С. Бельских, О.М. Урясьев, В.И. Звягина, С.В. Фалетрова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2018. – Т. 6, № 2. – С. 203-210.

33. Клинико-патогенетическое значение определения оксида азота в крови пациентов с бронхиальной астмой и гипертонической болезнью / А. В.

Шаханов, Э. С. Бельских, В. А. Луняков, О. М. Урясьев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Казанский медицинский журнал. – 2017. – Т. 98, № 4. – С. 492-496.

34. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кварцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88-91.

35. Кузнецова, В.Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия / В.Л. Кузнецова, А.Г. Соловьева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 462.

36. Левченкова, О.С. Митохондриальная пора как мишень фармакологического воздействия / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 24-33.

37. Лопатик, Д.В. Синтез и кардиопротекторная эффективность аргинина сукцината / Д.В. Лопатик, З.И. Куваева, О.М. Бондарева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2020. – Т. 56, № 2. – С. 181-186.

38. Лукьянова, Л.Д. Митохондриальная дисфункция – молекулярный механизм гипоксии / Л.Д. Лукьянова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Патогенез. – 2003. – № 1. – С. 52-67.

39. Лукьянова, Л.Д. Особенности срочной реакции ферментов дыхательной цепи в коре головного мозга крыс на гипоксию / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166, № 10. – С. 410-416.

40. Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии / Л.Д. Лукьянова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Москва : Российская академия наук. – 2019. – С. 215.

41. Малкова, Я.Г. Использование различных моделей гипоксии в экспериментальной фармакологии / Я.Г. Малкова, Г.В. Кальченко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Молодой ученый. – 2010. – № 3. – С. 318-319.

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

43. Марсянова, Ю. А. Изменение функциональной активности семенных пузырьков в условиях модуляции синтеза NO / Ю. А. Марсянова, В. И. Звягина. – Текст (визуальный) : непосредственный // 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.

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

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

46. Марсянова, Ю.А. Гипоксия-подобный эффект L-аргинина в семенных пузырьках и эпидидимисе крыс / Ю.А. Марсянова, В.И. Звягина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2023. – Т. 31, № 3. – С. 345-356.

47. Марсянова, Ю.А. Изменение количества HIF1 $\alpha$  при хронической нормобарической гипоксии и на фоне получения сукцината / Ю.А. Марсянова, В.И. Звягина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2021. – №4. – С. 72-80.

48. Марсянова, Ю.А. Изменение некоторых биохимических показателей митохондрий при адаптации к гипоксии / Ю.А. Марсянова, В.И. Звягина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2021. – №5. – С. 64-68.

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

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

51. Мембранный потенциал митохондрий тромбоцитов у пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких / Е.Г. Лобанова, Е.В. Кондратьева, Е.Е. Минеева, Ю.К. Караман. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 6. – С. 13-16.

52. Метаболиты оксида азота при развитии осложнений после открытых реконструктивных вмешательств у пациентов с периферическим атеросклерозом / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе [и др.]. – Текст

(визуальный) : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2021. – Т. 9, № 3. – С. 407-414.

53. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15-18.

54. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : учебное пособие / М. И. Прохорова ; ред. М. И. Прохорова. – Л. : Изд-во ЛГУ, 1982. – 272 с. : ил. – Б. ц. – Текст (визуальный) : непосредственный.

55. Механизмы развития острой гипоксии и пути ее фармакологической коррекции / М.А. Евсеева, А.В. Евсеев, В.А. Правдивцев, П.Д. Шабанов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 3-25.

56. Не настало ли время слома митохондриальной парадигмы и установления митохондриальной номенклатуры? / Д. Б. Зоров, Л. Д. Зорова, Н. В. Андрианова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 2022. – Т. 87, № 12. – С. 1868-1880.

57. Николаев, А. А. Биохимические механизмы ферроптоза / А. А. Николаев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Молекулярная медицина. – 2023. – Т. 21, № 2. – С. 19-24.

58. Новиков, В.Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, Е.В. Пожилова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12, № 4. – С. 13-21.

59. Новиков, В.Е. Фармакология и биохимия гипоксии / В.Е. Новиков, Н.П. Катунина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 73-87.

60. Овсянников, Е.С. Оценка эффективности тренировки дыхательной мускулатуры у больных хронической обструктивной болезнью лёгких и ожирением / Е.С. Овсянников, А.В. Будневский, Я.С. Шкатова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2019. – Т. 27, № 3. – С. 367-374.

61. Особенности влияния ингибиторов NO-синтазы на поведенческие показатели крыс / В.Г. Башкатова, Н.Г. Богданова, Е.В. Алексеева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2020. – Т. 28, № 3. – С. 275-282.

62. 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.

63. Пожилова, Е.В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 13-22.

64. Протективные эффекты L-аргинина на митохондрии эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой / В. И. Звягина, К. Б. Шумаев, Э. С. Бельских [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2022. – Т. 30, № 4. – С. 457-470.

65. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: «МедиаСфера», 2000. – 312 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

66. Русаков, В.В. Влияние индивидуальной устойчивости к гипоксии на сократительную функцию сердец крыс в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы / В.В. Русаков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Омский научный вестник. – 2006. – Т. 38, № 4. – С. 229-231.

67. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020611566 РФ. Программа определения уровня карбонильных производных белков и резервно-адаптационного потенциала в норме и при патологии / А.А. Абаленихин, Ю.В. Абаленихина, Е.Е. Груздев. – заявл. 27.01.2020; опубли. 04.02.2020. – Бюл. № 2. – 1 с. Тест (визуальный): непосредственный.

68. Серов, О.А. Очистка и свойства изофермента 5-лактатдегидрогеназы из скелетных мышц и печени крыс / О.Л. Серов, Ю.С. Нечаев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 1972. – № 37. – С. 1117-1125.

69. Смирнова, М.И. Хроническая обструктивная болезнь лёгких и COVID-19: данные к лету 2020 года, подходы к оказанию медицинской помощи и профилактике / М.И. Смирнова, Д.Н. Антипушина, А.С. Курехян. – Текст (визуальный) : непосредственный // Профилактическая медицина. – 2020. – Т. 23, № 8. – С. 37-44.

70. Сравнительная эффективность янтарной кислоты и Реамберина при окислительном стрессе в эксперименте / Н.В. Симонова, В.А. Доровских, А.В. Кропотов [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2018. – № 70. – С. 78-82.

71. Стасюк, О.Н. Экспериментальное исследование влияния дефицита кислорода на кислотно-основное состояние / О.Н. Стасюк, Е.В. Альфонсова, Н.Д. Авсеенко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 130-137.

72. Стручкова, И.В. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле / И.В. Стручкова, Е.А. Кальясова: Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородские университет, 2016. – 60 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

73. Сукцинат и сукцинатдегидрогеназа моноядерных лейкоцитов крови как маркеры адаптации митохондрий к гипоксии у больных при обострении хронической обструктивной болезни лёгких / Э.С. Бельских, О.М. Урясьев, В.И. Звягина, С.В. Фалетрова. – Текст (визуальный) : непосредственный //

Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2020. – Т. 28, № 1. – С. 13-20.

74. Сукцинат-рецепторная система костно-хрящевой ткани у пациентов с метаболическим фенотипом остеоартрита / Д. Р. Шодиев, В. И. Звягина, М. Н. Рябова, Ю. А. Марсянова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2024. – Т. 27, № 4. – С. 42-49.

75. Урясьев, О.М. Оксид азота и регуляторы его синтеза при хронической обструктивной болезни лёгких / О.М. Урясьев, А.В. Шаханов, Ж.К. Канатбекова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2021. – Т. 29, № 3. – С. 427-434.

76. Фармакокинетика сукцината у крыс после внутривенного введения препарата "Мексидол" / А. В. Щулькин, П. Ю. Мыльников, И. В. Черных [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 175, № 1. – С. 65-69.

77. Фармакологические эффекты нового стимулятора растворимой гуанилатциклазы при экспериментальной легочной артериальной гипертензии / В. В. Быков, А. В. Быкова, С. А. Станкевич [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. – 2023. – Т. 22, № 1. – С. 14-22.

78. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум / Калинингр. ун-т; Авт.-сост. Г.Н. Чупахина. – Калининград, 2000. – 59 с. – Текст (визуальный) : непосредственный

79. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – М.: Рязань, 2014. – 61 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

80. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора как предиктор резистентности организма лабораторных животных к гипоксии / А. Е. Ким, Е.

Б. Шустов, В. А. Кашуро [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Педиатр. – 2023. – Т. 14, № 1. – С. 61-71.

81. Якушева, Е. Н. Оценка эффективности этилметилгидроксипиридина сукцината при алкогольной абстиненции / Е. Н. Якушева, А. В. Щулькин, Ю. В. Абаленихина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Психофармакология и биологическая наркология. – 2024. – Т. 15, № 1. – С. 61-68.

82. A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: Henneguya) lacks a mitochondrial genome / D. Yahalomi, S.D. Atkinson, M. Neuhof [et al.]. – Text : visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – V. 117, № 10. – P. 5358-5363.

83. A novel epididymal quiescence factor inhibits sperm motility by modulating NOS activity and intracellular NO-cGMP pathway / P. Ghosh, S. Mukherjee, A. Bhoumik, S.R. Dungdung. – Text : visual // Journal of Cellular Physiology. – 2018. – V. 233, № 5. – P. 4345-4359.

84. Acidosis Maintains the Function of Brain Mitochondria in Hypoxia-Tolerant Triplefin Fish: A Strategy to Survive Acute Hypoxic Exposure? / J.B.L. Devaux, C.P. Hedges, N. Birch [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Physiology. – 2019. – № 9. – P. 1941.

85. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation / S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler [et al.]. – Text : visual // Nature. – 1999. – V. 399, № 6736. – P. 601-615.

86. Acute methylmercury exposure and the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signaling pathway under normoxic conditions in the rat brain and astrocytes in vitro / J. Chang, B. Yang, Y. Zhou [et al.]. – Text : visual // Environ Health Perspect. – 2019. – V. 127, № 12. – P. 127006.

87. Akhigbe, R.E. HAART exacerbates testicular damage and impaired spermatogenesis in anti-Koch-treated rats via dysregulation of lactate transport and glutathione content / R.E. Akhigbe, M.A. Hamed, A.O. Aremu. – Text : visual // Reproductive Toxicology. – 2021. – V. 103. – P. 96-107.

88. Allosteric transitions of rabbit skeletal muscle lactate dehydrogenase induced by pH-dependent dissociation of the tetrameric enzyme / L.G. Iacovino, M. Rossi, G. Di Stefano [et al.]. – Text : visual // *Biochimie*. – 2022. – V. 199. – P. 23-35.

89. Alteration in male reproductive system in experimental cholestasis: Roles for opioids and nitric oxide overproduction / S. Kiani, B. Valizadeh, B. Hormazdi [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Pharmacology*. – 2009. – V. 615. – № 1. – P. 246-251.

90. Altered expression of lactate dehydrogenase and monocarboxylate transporter involved in lactate metabolism in broiler wooden breast / D. Zhao, M.H. Kogut, K.J. Genovese [et al.]. – Text : visual // *Poultry Science Journal*. – 2020. – V. 99, № 1. – P. 11-20.

91. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics / L. Fagerberg, B.M. Hallström, P. Oksvold [et al.]. – Text : visual // *Molecular and Cellular Proteomics*. – 2014. – V. 13, № 2. – P. 397-406.

92. Antenatal hypoxia accelerates the onset of Alzheimer's Disease pathology in 5xFAD mouse model / G. Shen, S. Hu, Z. Zhao [et al.]. – Text : visual // *Front Aging Neurosci*. – 2020. – V. 21, № 12. – P. 251.

93. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats / J.H. Kim, L.J. Bugaj, Y.J. Oh [et al.]. – Text : visual // *Journal of Applied Physiology*. – 2009. – V. 107, № 4. – P. 1249-1257.

94. Armstrong, W. Experimental and modelling data contradict the idea of respiratory down-regulation in plant tissues at an internal [O<sub>2</sub>] substantially above the critical oxygen pressure for cytochrome oxidase / W. Armstrong, P.M. Beckett. – Text : visual // *New Phytologist*. – 2011. – V. 190, № 2. – P. 431-441.

95. Arnold, P.K.. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle / P.K. Arnold, L.W.S. Finley. – Text : visual // *Journal Of Biological Chemistry*. – 2023. – V. 299. – P. 102838.

96. Aryaman, J. Mitochondrial heterogeneity / J. Aryaman, I.G. Johnston, N.S. Jones. – Text : visual // *Frontiers in Genetics*. – 2019. – V. 25, № 9. – P. 718.
97. Banerjee, R. Gas regulation of complex II reversal via electron shunting to fumarate in the mammalian ETC / R. Banerjee, R. Kumar. – Text : visual // *Trends in Biochemical Science*. – 2022. – V. 47, № 8. – P. 689-698.
98. Beckman, J.S. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly / J.S. Beckman, W.H. Koppenol. – Text : visual // *American Journal of Physiology*. – 1996. – V. 271, № 5. – P. 1424-1437.
99. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration / G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo [et al.]. – Text : visual // *Chemical Review*. – 2018. – V. 118, № 3. – P. 1338-1408.
100. Biological network model of effect of chronic intermittent hypoxia on spermatogenesis in rats / J. Wang, X. Gong, F. Meng [et al.]. – Text : visual // *Medical Science Monitor*. – 2020. – V. 26. – P. e925579.
101. Bornstein, R. Mitochondrial pathways in human health and aging / R. Bornstein, B. Gonzalez, S.C. Johnson. – Text : visual // *Mitochondrion*. – 2020. – V. 54. – P. 72-84.
102. Brand, M.D. Assessing mitochondrial dysfunction in cells / Brand M.D., D.G. Nicholls. – Text : visual // *Biochemical Journal*. – 2011. – V. 435, № 2. – P. 297-312.
103. Briston, T. HIF-1 $\alpha$  localization with mitochondria: a new role for an old favorite? / T. Briston, J. Yang, M. Ashcroft. – Text : visual // *Cell Cycle*. – 2011. – V. 10, № 23. – P. 4170-4171.
104. Brooks, G.A. Lactate as a fulcrum of metabolism / G.A. Brooks. – Text : visual // *Redox Biology*. – 2020. – V. 35. – P.101454.
105. Brooks, G.A. The science and translation of lactate shuttle theory / G.A. Brooks. – Text : visual // *Cell Metabolism*. – 2018. – V. 27, № 4. – P. 757-785.
106. Cai, Z. Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health / Z. Cai, L.J. Yan. – Text : visual // *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*. – 2013. – V. 1, № 1. – P. 15-26.

107. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I / E.T. Chouchani, C. Methner, S.M. Nadtochiy [et al.]. – Text : visual // *Nature Medicine*. – 2013. – V. 19, № 6. – P. 753-759.

108. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor / M. Hirsilä, P. Koivunen, V. Günzler [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278, № 33. – P. 30772-30780.

109. Chinopoulos, C. The mystery of extramitochondrial proteins lysine succinylation / C. Chinopoulos. – Text : visual // *The International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22, № 11. – P. 6085.

110. Chronic and cycling hypoxia: drivers of cancer chronic inflammation through hif-1 and nf- $\kappa$ b activation: a review of the molecular mechanisms / J. Korbecki, D. Simińska, M. Gąssowska-Dobrowolska [et al.]. – Text : visual // *The International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22, № 19. – P. 10701.

111. Citrulline and arginine utility in treating nitric oxide deficiency in mitochondrial disorders / A.W. El-Hattab, L.T. Emrick, W.J. Craigen, F. Scaglia. – Text : visual // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2012. – V. 107, № 3. – P. 247-252.

112. Clin, Z. Chemical and clinical / Z. Clin. – Text : visual // *Biochemistry*. – 1972. – V.8. – P. 658.

113. Clinical efficacy of nitric oxide nasal spray (NONS) for the treatment of mild COVID-19 infection / S. Winchester, S. John, K. Jabbar, I. John. – Text : visual // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – V. 83, № 2. – P. 237-279.

114. Common and novel TMEM70 mutations in a cohort of italian patients with mitochondrial encephalocardiomyopathy / D. Diodato, F. Invernizzi, E. Lamantea [et al.]. – Text : visual // *JIMD Reports*. – 2015. – V. 15. – P. 71-78.

115. Compartmentalised acyl-CoA metabolism and roles in chromatin regulation / S. Trefely, C.D. Lovell, N.W. Snyder, K.E. Wellen. – Text : visual // *Molecular Metabolism*. – 2020. – № 38. – P. 100941.

116. Compensatory role of endogenous sulfur dioxide in nitric oxide deficiency-induced hypertension / Y. Song, J. Song, Z. Zhu [et al.]. – Text : visual // *Redox Biology*. – 2021. – V. 18, № 48. – P. 102192.

117. Contributions of nitric oxide synthases, dietary nitrite/nitrate, and other sources to the formation of NO signaling products / A.B. Milsom, B.O. Fernandez, M.F. Garcia-Saura [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants & redox signaling*. – 2012. – V. 17, № 3. – P. 422-432.

118. COVID-19-associated acute limb ischemia in a patient on therapeutic anticoagulation / J.C. Gubitosa, P. Xu, A. Ahmed [et al.]. – Text : visual // *Cureus*. – 2020. – V. 12, № 9. – P. e10655.

119. Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications / P. Sarti, E. Forte, D. Mastronicola [et al.]. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – V. 1817, № 4. – P. 610-619.

120. Davies, M.J. Protein oxidation and peroxidation / M.J. Davies. – Text : visual // *Biochemical Journal*. – 2016. – V. 473, № 7. – P. 805-825.

121. Dean, J.B. Hypercapnia causes cellular oxidation and nitrosation in addition to acidosis: implications for CO<sub>2</sub> chemoreceptor function and dysfunction / J.B. Dean. – Text : visual // *Journal of Applied Physiology*. – 2010. – V. 108, № 6. – P. 1786-1795.

122. Deen, P.M. Succinate receptors in the kidney / P.M. Deen, J.H. Robben. – Text : visual // *The Journal of the American Society of Nephrology*. – 2011. – V. 22, № 8. – P. 1416-1422.

123. Dinitrosyl iron complexes bind with hemoglobin as markers of oxidative stress / K.B. Shumaev, O.V. Kosmachevskaya, A.F. Topunov [et al.]. – Text : visual // *Methods in Enzymology*. – 2008. – V. 436. – P. 445-461.

124. Divergent gene expression in the gills of juvenile turbot (*Psetta maxima*) exposed to chronic severe hypercapnia indicates dose-dependent increase in intracellular oxidative stress and hypoxia / B.T. Hermann, S. Wuertz, K.H. Vanselow [et al.]. – Text : visual // *Aquatic Toxicology*. – 2019. – V. 206. – P. 72-80.

125. Dusting, G.J. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall / G.J. Dusting, S. Selemidis, F. Jiang. – Text : visual // *Memoirs of the Oswaldo Cruz Institute*. – 2005. – V. 100, № 1. – P. 97-103.

126. Dynamic profiling and functional interpretation of histone lysine crotonylation and lactylation during neural development / S.K. Dai, P.P. Liu, X. Li [et al.]. – Text : visual // *Development*. – 2022. – V. 149, № 14. – P. 200049.

127. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats / A. Szabolcs, R.J. Reiter, T. Letoha [et al.]. – Text : visual // *World Journal of Gastroenterology*. – 2006. – V. 12, № 2. – P. 251-258.

128. Effect of sodium cyanide-induced tissue hypoxia on reproductive capability of male mice and the protective effect of ethyl pyruvate / M.R. Nourani, A. Kalantari Hesari, R. Shahrooz, M.R. Asadi. – Text : visual // *Archives of Razi*. – 2021. – V. 76, № 2. – P. 323-333.

129. Effects of acute, profound hypoxia on healthy humans: implications for safety of tests evaluating pulse oximetry or tissue oximetry performance / P.E. Bickler, J.R. Feiner, M.S. Lipnick [et al.]. – Text : visual // *Anesthesia & Analgesia*. – 2017. – V. 124, № 1. – P. 146-153.

130. Effects of environmental and pathological hypoxia on male fertility / Z. Li, S. Wang, C. Gong [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – V. 13, № 9. – P. 725933.

131. Effects of F(I)O<sub>2</sub> on leg VO<sub>2</sub> during cycle ergometry in sedentary subjects / J. Cardús, R.M. Marrades, J. Roca [et al.]. – Text : visual // *Medicine & Science in Sports & Exercise*. – 1998. – V. 30, № 5. – P. 697-703.

132. Effects of inhaled nitric oxide in COVID-19-induced ARDS – Is it worthwhile? / C. Lotz, R.M. Muellenbach, P. Meybohm [et al.]. – Text : visual // *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. – 2021. – V. 65, № 5. – P. 629-632.

133. Empirical therapy for male factor infertility: Survey of the current practice / A.M. Al Khayal, F.K. Balaraj, T.A. Alferayan [et al.]. – Text : visual // *Urology Annals*. – 2021. – V. 13, № 4. – P. 346-350.

134. Endothelial dysfunction driven by hypoxia-the influence of oxygen deficiency on NO bioavailability / A. Janaszak-Jasiecka, A. Siekierzycka, A. Płoska [et al.]. – Text : visual // *Biomolecules*. – 2021. – V. 11, № 7. – P. 982.

135. Endothelial nitric oxide deficiency results in abnormal placental metabolism / H. George, K.L. Steeves, G.V. Mercer [et al.]. – Text : visual // *Placenta*. – 2022. – V. 29, № 128. – P. 36-38.

136. Endothelial nitric oxide synthase deficiency alters neurovascular coupling and brain glutamine metabolism / A. Hariharan, Y. Jing, N.D. Collie [et al.]. – Text : visual // *Alzheimer's & Dementia*. – 2018. – V. 14, № 7. – P. 1146.

137. Estradiol protects against cardiorespiratory dysfunctions and oxidative stress in intermittent hypoxia / S. Laouafa, A. Ribon-Demars, F. Marcouiller [et al.]. – Text : visual // *Sleep*. – 2017. – V. 40, № 8. – P. 104-106.

138. Evaluation of Triclosan-induced reproductive impairments in the accessory reproductive organs and sperm indices in the mice / S. Raj, S.S. Singh, S.P. Singh, P. Singh. – Text : visual // *Acta Histochemica*. – 2021. – V. 123, № 5. – P. 151744.

139. Expression and localization of hypoxia-inducible factor-1 subunits in the adult rat epididymis / M.A. Palladino, J.D. Powell, N. Korah, L. Hermo. – Text : visual // *Biology of Reproduction*. – 2004. – V. 70, № 4. – P. 1121-1130.

140. Expression of a truncated active form of VDAC1 in lung cancer associates with hypoxic cell survival and correlates with progression to chemotherapy resistance / M.C. Brahimi-Horn, D. Ben-Hail, M. Ilie [et al.]. – Text : visual // *Cancer Research*. – 2012. – V. 72, № 8. – P. 2140-2150.

141. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (LDHc) is required for male fertility / F. Odet, C. Duan, W.D. Willis [et al.]. – Text : visual // *Biology of Reproduction*. – 2008. – V. 79, № 1. – P. 26-34.

142. Extreme terrestrial environments: life in thermal stress and hypoxia / M. Burtscher, H. Gatterer, J. Burtscher, H. Mairbäurl. – Text : visual // *Frontiers in Physiology*. – 2018. – V. 16, № 9. – P. 572.

143. Fong, GH. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins / G.H. Fong, K. Takeda. – Text : visual // Cell Death & Differentiation. – 2008. – V. 15. – P. 635- 641.

144. Full-face mask use during scuba diving counters related oxidative stress and endothelial dysfunction / M. Levenez, K. Lambrechts, S. Mrakic-Sposta, [et al.]. – Text : visual // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2022. – V. 19, № 2. – P. 965.

145. Glushkov, S.P. The impact of night normobaric hypoxia and interval hypoxic training on the body of athletes / S.P. Glushkov, V.M. Osipov, E.V. Pishchalov. – Text : visual // Siberian pedagogical journal. – 2015. – V. 3. – P. 153-158.

146. Glutathione-related substances maintain cardiomyocyte contractile function in hypoxic conditions / Y.M. Poluektov, I.Y. Petrushanko, N.A. Undrovinas [et al.]. – Text : visual // Science Report. – 2019. – № 9. – P. 4872.

147. Guideline for the diagnosis of pediatric mitochondrial disease: the value of muscle and skin biopsies in the genetics era / S.B. Wortmann, J.A. Mayr, J.M. Nuoffer [et al.]. – Text : visual // Neuropediatrics. – 2017. – V. 48, № 4. – P. 309-314.

148. Guzy, R.D. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia / R.D. Guzy, P.T. Schumacker. – Text : visual // Experimental Physiology. – 2006. – V. 91, № 5. – P. 807-819.

149. Habib, S. Biochemistry of nitric oxide / S. Habib, A. Ali. – Text : visual // Indian Journal of Clinical Biochemisrty. – 2011. – V. 26, № 1. – P. 3-17.

150. Hargreaves, M. Skeletal muscle energy metabolism during exercise / M. Hargreaves, L.L. Spriet. – Text : visual // Nature Metabolism. – 2020. – № 2. – P. 817-828.

151. Hawkins, C.L. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications / C.L. Hawkins, M.J. Davies. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2019. – V. 294, № 51. – P. 19683-19708.

152. Heme-containing oxygenases / M. Sono, M.P. Roach, E.D. Coulter, J.H. Dawson. – Text : visual // *Chemical Review*. – 1996. – V. 96, № 7. – P. 2841 – 2888.

153. Herb, M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity / M. Herb, M. Schramm. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2021. – V. 10, № 2. – P. 313.

154. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells / R. Fukuda, H. Zhang, J.W. Kim [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 2007. – V. 129, № 1. – P. 111-122.

155. HIF-1 $\alpha$  inhibits mitochondria-mediated apoptosis and improves the survival of human adipose-derived stem cells in ischemic microenvironments / J. Wang, H. Wu, Y. Zhou [et al.]. – Text : visual // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. – 2021. – V. 74, № 8. – P. 1908-1918.

156. HIF-1 $\alpha$  protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria / H.S. Li, Y.N. Zhou, L. Li [et al.]. – Text : visual // *Redox Biology*. – 2019. – V. 25. – P. 101 – 109.

157. Histone succinylation and its function on the nucleosome / J. Liu, Y. Shangguan, D. Tang, Y. Dai. – Text : visual // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2021. – V. 25, № 15. – P. 7101 – 7109.

158. Hotta, Y. Testosterone deficiency and endothelial dysfunction: nitric oxide, asymmetric dimethylarginine, and endothelial progenitor cells / Y. Hotta, T. Kataoka, K. Kimura. – Text : visual // *Sexual Medicine Reviews*. – 2019. – V. 7, № 4. – P. 661 – 668.

159. Hutteman, M. Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase / M. Hutteman, B. Kadenbach, L.I. Grossman. – Text : visual // *Gene*. – 2001. – V. 267. – P. 111 – 123.

160. Hydrogen peroxide accumulation in the choroid during intermittent hypoxia increases risk of severe oxygen-induced retinopathy in neonatal rats / K.D. Beharry, C.L. Cai, P. Sharma [et al.]. – Text : visual // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2013. – V. 54, № 12. – P. 7644 – 7657.

161. Hypercapnia exacerbates the blood-brain barrier disruption via promoting HIF-1a nuclear translocation in the astrocytes of the hippocampus: implication in further cognitive impairment in hypoxemic adult rats / X. Liu, H. Ding, X. Li [et al.]. – Text : visual // *Neurochemical Research*. – 2020. – V. 45, № 7. – P. 1674 – 1689.

162. Hypoxia and brain aging: Neurodegeneration or neuroprotection? / J. Burtscher, R.T. Mallet, M. Burtscher, G.P. Millet. – Text : visual // *Ageing Research Reviews*. – 2021. – V. 68. – P. 101343.

163. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in kidney injury and repair / S. Shu, Y. Wang, M. Zheng [et al.]. – Text : visual // *Cells*. – 2019. – V. 28, № 8. – P. 207.

164. Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of HIF genes / A.A. Tirpe, D. Gulei, S.M. Ciortea [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20, № 24. – P. 6140.

165. Hypoxia-induced alteration of RNA modifications in the mouse testis and sperm / T. He, H. Guo, X. Shen [et al.]. – Text : visual // *Biology of Reproduction*. – 2021. – V. 105, № 5. – P. 1171-1178.

166. Hypoxia-induced lactate dehydrogenase A protects cells from apoptosis in endometriosis / J. Zheng, Y. Dai, X. Lin [et al.]. – Text : visual // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2021. – V. 24, № 3. – P. 637.

167. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1A) cooperates with the cohesin complex component rad21 to stimulate neuronal nitric oxide synthase (NOS1) transcription by modifying chromatin conformation / F. Gao, Y. Hayashi, S.A. Saravanaperumal [et al.]. – Text : visual // *Gastroenterology*. – 2019. – V. 156, № 6. – P. 211.

168. Hypoxia-reduced nitric oxide synthase activity is partially explained by higher arginase-2 activity and cellular redistribution in human umbilical vein endothelium / C.P. Prieto, B.J. Krause, C. Quezada [et al.]. – Text : visual // *Placenta*. – 2011. – V. 32, № 12. – P. 932-940.

169. Hypoxia-related long noncoding RNAs are associated with varicocele-related male infertility / N.S. Ata-Abadi, S.J. Mowla, F. Aboutalebi [et al.]. – Text : visual // PLOS One. – 2020. – V. 15, № 4. – P. e0232357.

170. Hypoxically induced nitric oxide: potential role as a vasodilator in mytilus edulis gills / P.M. González, I. Rocchetta, D. Abele, G.A. Rivera-Ingraham. – Text : visual // Frontiers in Physiology. – 2019. – V. 5, № 9. – P. 1709.

171. Ibukun, P.O. Nitric oxide synthase inhibition ameliorates nicotine-induced sperm function decline in male rats / P.O. Ibukun, R. Yinusa, F.B. Adeyombo [et al.]. – Text : visual // Asian Pacific Journal of Reproduction. – 2015. – V. 4, № 3. – P. 212-216.

172. Inhibitory effect of rhubarb on intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity in type 1 diabetic rats / K.J. Hou, C.J. Lin, C. Chen [et al.]. – Text : visual // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. – 2017. – V. 16, № 6. – P. 1293-1297.

173. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. J. Gilissen, F. Jouret, B. Pirotte, J. Hanson. – Text : visual // Pharmacology & Therapeutics. – 2016. – № 159. – P. 56-65.

174. Intermittent Hypoxia and Weight Loss: Insights into the Etiology of the Sleep Apnea Phenotype / M. Gagnon, S. Fournier, F. Marcouiller [et al.]. – Text : visual // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2023. – № 1427. – P. 61-71.

175. Intermittent hypoxia increases ROS/HIF-1 $\alpha$  'related oxidative stress and inflammation and worsens bleomycin-induced pulmonary fibrosis in adult male C57BL/6J mice / M. Xiong, Y. Zhao, H. Mo [et al.]. – Text : visual // International Immunopharmacology. – 2021. – V. 100. – P. 108165.

176. JS-K induces reactive oxygen species-dependent anti-cancer effects by targeting mitochondria respiratory chain complexes in gastric cancer / X. Zhao, A. Cai, Z. Peng [et al.]. – Text : visual // Journal of Cellular and Molecular Medicine – 2019. – V. 23, № 4. – P. 2489-2504.

177. Kim, N.N. Role of arginase in the male and female sexual arousal response / N.N. Kim, D.W. Christianson, A.M. Traish. – Text : visual // *Journal of Nutrition*. – 2004. – V. 134. – P. 2873S-2879S.

178. Kocianova, E. Revisiting the Warburg effect with focus on lactate / E. Kocianova, V. Piatrikova, T. Golias. – Text : visual // *Cancers*. – 2022. – V. 7, № 14. – P. 6028.

179. Kosmachevskaya, O.V. Electrophilic signaling: the role of reactive carbonyl compounds / O.V. Kosmachevskaya, K.B. Shumaev, A.F. Topunov. – Text : visual // *Biochemistry*. – 2019. – V. 84. – P. S206-S224.

180. Kuo, M.T. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes / M.T. Kuo, N. Savaraj, L.G. Feun. – Text : visual // *Oncotarget*. – 2010. – V. 1, № 4. – P. 246-251.

181. Lactate metabolism is essential in early-onset mitochondrial myopathy / Z. Chen, B. Bordieanu, R. Kesavan [et al.]. – Text : visual // *Science Advances*. – 2023. – V. 9, №4. – P. eadd3216.

182. Lactylation may be a novel posttranslational modification in inflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy / Y. Zhou, L. Yang, X. Liu, H. Wang. – Text : visual // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – V. 2, № 13. – P. 926802.

183. L-Arginine administration reverses anemia associated with renal disease / T. Tarumoto, S. Imagawa, M. Kobayashi [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Hematology*. – 2007. – V. 86. – P. 126-129.

184. L-Arginine supplementation improves vascular endothelial dysfunction induced by high-fat diet in rats exposed to hypoxia / Y.X. Zhao, L. Tong, G.M. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Wilderness & Environmental Medicine*. – 2020. – V. 31, № 4. – P. 400-406.

185. Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes / N.J. Lake, A.G. Compton, S. Rahman, D.R. Thorburn. – Text : visual // *Annals of Neurology*. – 2016. – V. 79, № 2. – P. 190-203.

186. Lin, Q. Differential hypoxic regulation of hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  / Q. Lin, X. Cong, Z. Yun. – Text : visual // Molecular Cancer Research. – 2011. – V. 9, № 6. – P. 757-765.

187. Liu, P.Q. Molecular mechanism of nitric oxide in preventing cardiomyocytes from hypertrophic response induced by angiotensin II / P.Q. Liu, W. Lu, J.Y. Pan. – Text : visual // Sheng Li Xue Bao. – 2002. – V. 54, № 3. – P. 213-218.

188. L-NAME releases nitric oxide and potentiates subsequent nitroglycerin-mediated vasodilation / T. Liu, M. Zhang, G.T. Mukosera [et al.]. – Text : visual // Redox Biology. – 2019. – V. 26. – P. 101238.

189. Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation / B.T. Weinert, C. Schölz, S.A. Wagner [et al.]. – Text : visual // Cell Reports. – 2013. – V. 4, № 4. – P. 842-851.

190. Lysine-222 succinylation reduces lysosomal degradation of lactate dehydrogenase a and is increased in gastric cancer / X. Li, C. Zhang, T. Zhao [et al.]. – Text : visual // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2020. – V. 39, № 1. – P. 172.

191. Mauvais-Jarvis, F. Sex differences in energy metabolism: natural selection, mechanisms and consequences / F. Mauvais-Jarvis. – Text : visual // Nature Reviews Nephrology. – 2024. – V. 20, №1. – P. 56-69.

192. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase / S. Pou, L. Keaton, W. Surichamorn, G.M. Rosen. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – V. 274, № 14. – P. 9573-9580.

193. Mechanism of the reaction of human manganese superoxide dismutase with peroxynitrite: nitration of critical tyrosine 34 / V. Demicheli, D.M. Moreno, G.E. Jara [et al.]. – Text : visual // Biochemistry. – 2016. – V. 55, № 24. – P. 3403-3417.

194. Meiser, H. Detection and localization of two constitutive NOS isoforms in bull spermatozoa / H. Meiser, R. Schulz. – Text : visual // *Embryology*. – 2003. – V. 32. – P. 321-325.

195. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation / Zhang D., Z. Tang, H. Huang [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2019. – V. 574, № 7779. – P. 575-580.

196. Meyerstein, D. What are the oxidizing intermediates in the fenton and fenton-like reactions? A Perspective / D. Meyerstein. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2022. – V. 11, № 7. – P. 1368.

197. Mild metabolic perturbations alter succinylation of mitochondrial proteins / H. Chen, H. Xu, S. Potash [et al.]. – Text : visual // *Journal of Neuroscience Research*. – 2017. – V. 95, № 11. – P. 2244-2252.

198. MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations / S. Rath, R. Sharma, R. Gupta [et al.]. – Text : visual // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – V. 8, № 49. – P.1541-1547.

199. Mitochondria and hypoxic signaling: a new view / R.O. Poyton, P.R. Castello, K.A. Ball [et al.]. – Text : visual // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2009. – V. 1177. – P. 48-56.

200. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia / H. Zhang, M. Bosch-Marce, L.A. Shimoda [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283, № 16. – P. 10892-10903.

201. Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy / K. Hadrava Vanova, M. Kraus, J. Neuzil, J. Rohlena. – Text : visual // *Redox Report*. – 2020. – № 1. – P. 26-32.

202. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) / R.Z. Zhao, S. Jiang, L. Zhang, Z.B. Yu. – Text : visual // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2019. – V. 44, № 1. – P. 3-15.

203. Mitochondrial mechanisms by which gasotransmitters (H<sub>2</sub>S, NO and CO) protect cardiovascular system against hypoxia / I. Shemarova, V. Nesterov, L.

Emelyanova, S. Korotkov. – Text : visual // *Frontiers in Bioscience-Scholar*. – 2021. – V. 13, № 2. – P. 105-130.

204. Mitochondrial oxidative stress promotes cardiac remodeling in myocardial infarction through the activation of endoplasmic reticulum stress / F.V. Souza-Neto, F. Islas, S. Jiménez-González [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2022. – V. 11, № 7. – P. 1232.

205. Mohyeldin, A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche / A. Mohyeldin, T. Garzón-Muvdi, A. Quiñones-Hinojosa. – Text : visual // *Cell Stem Cell*. – 2010. – V. 7, № 2. – P. 150-161.

206. Moustafa, A. Changes in nitric oxide, carbon monoxide, hydrogen sulfide and male reproductive hormones in response to chronic restraint stress in rats / A. Moustafa. – Text : visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – V. 162. – P. 353-366.

207. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy. – Text : visual // *Biochemical Journal*. – 2009. – V. 417, № 1. – P. 1-13.

208. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity is regionally regulated by acute hypoxia in naked mole-rat brain / E. Farhat, M.E.M. Devereaux, H. Cheng [et al.]. – Text : visual // *Neuroscience Letters*. – 2021. – V. 1, № 764. – P. 136244.

209. NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology / A. Vermot, I. Petit-Härtlein, S.M.E. Smith, F. Fieschi. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2021. – V. 10, № 6. – P. 890.

210. Nagendran, J. Mitochondrial NOS is upregulated in the hypoxic heart: implications for the function of the hypertrophied right ventricle / J. Nagendran, E.D. Michelakis. – Text : visual // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2009. – V. 296, № 6. – P. 1723-1726.

211. Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice / A. Huang, D. Sun, E.G. Shesely [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. – 2002. – V. 282, № 2. – P. 429-436.

212. Nitric oxide and cancer: when to give and when to take away? / K.M. Miranda, L.A. Ridnour, C.L. McGinity [et al.]. – Text : visual // *Inorganic Chemistry*. – 2021. – V. 60, № 21. – P. 15941-15947.

213. Nitric Oxide deficiency linking a defective minipuberty to the appearance of comorbidities: new therapeutic possibilities / K. Chachlaki, A. Messina, V. Delli [et al.]. – Text : visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2022. – V. 189, № 1. – P. 14.

214. Nitric oxide pros and cons: The role of L-arginine, a nitric oxide precursor, and idebenone, a coenzyme-Q analogue in ameliorating cerebral hypoxia in rat / N.A. Abdel Baky, Z.F. Zaidi, A.J. Fatani [et al.]. – Text : visual // *Brain Research Bulletin*. – 2010. – V. 83, № 1–2. – P. 49-56.

215. Nolfi-Donagan, D. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement / D. Nolfi-Donagan, A. Braganza, S. Shiva. – Text : visual // *Redox Biology*. – 2020. – V. 37. – P. 101674.

216. Non-canonical mechanisms regulating hypoxia-inducible factor 1 alpha in cancer / L. Iommarini, A.M. Porcelli, G. Gasparre, I. Kurelac. – Text : visual // *Frontiers in oncology*. – 2017. – V. 27, № 7. – P. 286.

217. Non-canonical targets of HIF1 $\alpha$  impair oligodendrocyte progenitor cell function / K.C. Allan, L.R. Hu, M.A. Scavuzzo [et al.]. – Text : visual // *Cell stem cell*. – 2021. – V. 28, № 2. – P. 257-272.

218. Obstructive sleep apnea activates hif-1 in a hypoxia dose-dependent manner in hct116 colorectal carcinoma / C.A. Martinez, B. Kerr, C. Jin [et al.]. – Text : visual // *Journal of Molecular Science*. – 2019. – V. 20, № 2. – P. 445.

219. Ogasawara, E. Distal control of mitochondrial biogenesis and respiratory activity by extracellular lactate caused by large-scale deletion of mitochondrial DNA / E. Ogasawara, K. Nakada, N. Ishihara. – Text : visual // *Pharmacol Research*. – 2020. – V. 15, № 160. – P. 105204.

220. Overexpression of mitochondrial ferritin enhances blood-brain barrier integrity following ischemic stroke in mice by maintaining iron homeostasis in

endothelial cells / P. Wang, Q. Ren, M. Shi [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2022. – V. 11, № 7. – P. 1257.

221. Oxidations of N(omega)-hydroxyarginine analogues and various N-hydroxyguanidines by NO synthase II: key role of tetrahydrobiopterin in the reaction mechanism and substrate selectivity / C. Moali, J.L. Boucher, A. Renodon-Corniere [et al.]. – Text : visual // *Chemical Research in Toxicology*. – 2001. – V. 14, № 2. – P. 202-210.

222. Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity / S. Alvarez, L.B. Valdez, T. Zaobornyj, A. Boveris. – Text : visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2003. – V. 305, № 3. – P. 771-775.

223. Oxygen tension and the vhl-hif1 $\alpha$  pathway determine onset of neuronal polarization and cerebellar germinal zone exit / J.A. Kullmann, N. Trivedi, D. Howell [et al.]. – Text : visual // *Neuron*. – 2020. – V. 106, № 4. – P. 607-623.

224. Panov, A.V. Long-Chain and Medium-Chain Fatty Acids in Energy Metabolism of Murine Kidney Mitochondria / A.V. Panov, V.I. Mayorov, A.E. Dikalova [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – № 24(1). – P. 379.

225. Pathogenic variants in MT-ATP6: A United Kingdom-based mitochondrial disease cohort study / Y.S. Ng, M.H. Martikainen, G.S. Gorman [et al.]. – Text : visual // *Annals of Neurology*. – 2019. – V. 86, № 2. – P. 310-315.

226. Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases / P.S. Chen, W.T. Chiu, P.L. Hsu [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biomedical Science*. – 2020. – V. 27, № 1. – P. 63.

227. Pharmacological characterization of the mechanisms underlying the vascular effects of succinate / L.N. Leite, N.A. Gonzaga, J.A. Simplicio [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Pharmacology*. – 2016. – V. 789. – P. 334-343.

228. Polysaccharides as antioxidants and prooxidants in managing the double-edged sword of reactive oxygen species / F.S. Zeng, Y.F. Yao, L.F. Wang, W.J. Li. – Text : visual // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2023. – V. 159. – P. 114221.

229. Postischemic deactivation of cardiac aldose reductase: role of glutathione S-transferase P and glutaredoxin in regeneration of reduced thiols from sulfenic acids / K. Wetzelberger, S.P. Baba, M. Thirunavukkarasu [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285, № 34. – P. 26135-26148.

230. Prabhakar, N.R. Hypoxia-inducible factors and obstructive sleep apnea / N.R. Prabhakar, Y.J. Peng, J. Nanduri. – Text : visual // *Journal of Clinical Investigation*. – 2020. – V. 130, № 10. – P. 5042-5051.

231. Properties of a lactate-induced relaxation in human placental arteries and veins / H.A. Omar, R. Figueroa, N. Tejani, M.S. Wolin. – Text : visual // *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. – 1993. – V. 169, № 4. – P. 912-918.

232. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265-275.

233. Pyruvate promotes tumor angiogenesis through HIF-1-dependent PAI-1 expression / S.Y. Jung, H.S. Song, S.Y. Park [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Oncology*. – 2011. – V. 38, № 2. – P. 571-576.

234. Quantification of lactoyl-CoA (lactyl-CoA) by liquid chromatography mass spectrometry in mammalian cells and tissues / E.L. Varner, S. Trefely, D. Bartee [et al.]. – Text : visual // *Open Biology*. – 2020. – V. 10, № 9. – P. 200187.

235. Reactive oxygen species – sources, functions, oxidative damage / K. Jakubczyk, K. Dec, J. Kałduńska [et al.]. – Text : visual // *Polski Merkurusz Lekarski*. – 2020. – V. 48, № 284. – P. 124-127.

236. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator / M. Hasanuzzaman, M.H.M.B. Bhuyan, F. Zulfiqar [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2020. – V. 9, № 8. – P. 681.

237. Reactive oxygen species: players in the cardiovascular effects of testosterone / R.C. Tostes, F.S. Carneiro, M.H. Carvalho, J.F. Reckelhoff. – Text : visual // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2016. – V. 310, № 1. – P. 1-14.

238. Reactive oxygen species-induced changes in glucose and lipid metabolism contribute to the accumulation of cholesterol in the liver during aging / E. Seo, H. Kang, H. Choi [et al.]. – Text : visual // *Aging Cell*. – 2019. – V. 18, № 2. – P. e12895.

239. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 $\alpha$  / T. Hagen, C.T. Taylor, F. Lam, S. Moncada. – Text : visual // *Science*. – 2003. – V. 302, № 5652. – P. 1975-1978.

240. Redox differences between rat neonatal and adult cardiomyocytes under hypoxia / A.D. Ivanova, D.A. Kotova, Y.V. Khramova [et al.]. – Text : visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2024. – V. 211. – P. 145-157.

241. Regard, J.B. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression / J.B. Regard, I.T. Sato, S.R. Coughlin. – Text : visual // *Cell*. – 2008. – V. 135, № 3. – P. 561-571.

242. Regulation of UCP1 and mitochondrial metabolism in brown adipose tissue by reversible succinylation / G. Wang, J.G. Meyer, W. Cai [et al.]. – Text : visual // *Molecular Cell*. – 2019. – V. 74, № 4. – P. 844-857.

243. ROS and cGMP signaling modulate persistent escape from hypoxia in *Caenorhabditis elegans* / L. Zhao, L.A. Fenk, L. Nilsson [et al.]. – Text : visual // *PLOS Biology*. – 2022. – V. 20, № 6. – P. e3001684.

244. Schlieben, L.D. The dimensions of primary mitochondrial disorders / L.D. Schlieben, H. Prokisch. – Text : visual // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – V. 6, № 8. – P. 600079.

245. Schumacker, P.T. Hypoxia, anoxia, and O<sub>2</sub> sensing: the search continues / P.T. Schumacker. – Text : visual // *American Journal of Physiology*. – 2002. – V. 283, № 5. – P. 918-921.

246. SDHA mutation with dominant transmission results in complex II deficiency with ocular, cardiac, and neurologic involvement / C. Courage, C.B. Jackson, D. Hahn [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Medical Genetics*. – 2017. – V. 173, № 1. – P. 225-230.

247. Seliwanoff, T. Berichte der deutschen chemischen / T. Seliwanoff. – Text : visual // Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. – 1887. – V. 20, № 1. – P. 181-182.

248. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D.P. Jones. – Text : visual // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2020. – № 7. – P. 363-383.

249. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS / Z.F. Lin, H.B. Xu, J.Y. Wang [et al.]. – Text : visual // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2013. – V. 441, № 1. – P. 191-195.

250. Steinman, Y. Exposure to hypoxia impairs helicopter pilots' awareness of environment / Y. Steinman, E. Groen, M.H.W. Frings-Dresen. – Text : visual // Ergonomics. – 2021. – V. 64, № 11. – P. 1481-1490.

251. Stemness of human pluripotent cells: hypoxia-like response induced by low nitric oxide / E. Caballano-Infantes, I. Díaz, A.B. Hitos [et al.]. – Text : visual // Antioxidants. – 2021. – V. 10, № 9. – P. 1408.

252. Strahl, J. Nitric oxide mediates metabolic functions in the bivalve *Arctica islandica* under hypoxia / J. Strahl, D. Abele. – Text : visual // PLOS One. – 2020. – V. 15, № 5. – P. e0232360.

253. Strowitzki, M.J. Protein hydroxylation by hypoxia-inducible factor (hif) hydroxylases: unique or ubiquitous? / M.J. Strowitzki, E.P. Cummins, C.T. Taylor. – Text : visual // Cells. – 2019. – V. 8, № 5. – P. 384.

254. Stuehr, D. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases / D. Stuehr, S. Pou, G.M. Rosen [et al.]. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276, № 18. – P. 14533-14536.

255. Succinate as a signaling molecule in the mediation of liver diseases / H. Chen, C. Jin, L. Xie, J. Wu. – Text : visual // Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease. – 2024. – V. 1870, № 2. – P. 166935.

256. Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1 $\alpha$ /VEGF axis / Y. Li, Y. Liu, C. Wang [et al.]. – Text : visual // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – V. 126. – P. 1-14.

257. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1b through HIF-1a / G.M. Tannahill, A.M. Curtis, J. Adamik [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2013. – V. 496, № 7444. – P. 238-242.

258. Succinate level is increased and succinate dehydrogenase exerts forward and reverse catalytic activities in lipopolysaccharides-stimulated cardiac tissue: The protective role of dimethyl malonate / Y. Wang, H. Tao, W. Tang [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Pharmacology*. – 2023. – V. 940. – P. 175472.

259. Succinate supplement elicited "pseudohypoxia" condition to promote proliferation, migration, and osteogenesis of periodontal ligament cells / H. Mao, A. Yang, Y. Zhao [et al.]. – Text : visual // *Stem Cells International*. – 2020. – V. 2020. – P. 2016809.

260. SUCLA2-coupled regulation of GLS succinylation and activity counteracts oxidative stress in tumor cells / Y. Tong, D. Guo, S.H. Lin [et al.]. – Text : visual // *Molecular Cell*. – 2021. – V. 81, № 11. – P. 2303-2316.

261. Suh, J. Mitochondria as secretory organelles and therapeutic cargos / J. Suh, Y.S. Lee. – Text : visual // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2024. – V. 56, №1. – P. 66-85.

262. Supplemental CO<sub>2</sub> improves oxygen saturation, oxygen tension, and cerebral oxygenation in acutely hypoxic healthy subjects / J. Stepanek, R.A. Dunn, G.N. Pradhan, M.J. Cevette. – Text : visual // *Physiological Reports*. – 2020. – V. 8, № 14. – P. e14513.

263. Switch of mitochondrial superoxide dismutase into a prooxidant peroxidase in manganese-deficient cells and mice / D. Ganini, J.H. Santos, M.G. Bonini, R.P. Mason. – Text : visual // *Cell Chemical Biology*. – 2018. – V. 25, № 4. – P. 413-425.

264. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis / P. Sonveaux, T. Copetti, C.J. De Saedeleer [et al.]. – Text : visual // *PLOS One*. – 2012. – V. 7, № 3. – P. e33418.

265. Tejero, J. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation / J. Tejero, S. Shiva, M.T. Gladwin. – Text : visual // *Physiology Review*. – 2019. – V. 99, № 1. – P. 311-379.

266. The biochemical and clinical perspectives of lactate dehydrogenase: an enzyme of active metabolism / A.A. Khan, K.S. Allemailem, F.A. Alhumaydhi [et al.]. – Text : visual // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. – 2020. – V. 20, № 6. – P. 855-868.

267. The crosstalk between HIFs and mitochondrial dysfunctions in cancer development / X. Bao, J. Zhang, G. Huang [et al.]. – Text : visual // *Cell Death & Disease*. – 2021. – V. 12, № 2. – P. 215.

268. The diversification and lineage-specific expansion of nitric oxide signaling in Placozoa: insights in the evolution of gaseous transmission / L.L. Moroz, D.Y. Romanova, M.A. Nikitin [et al.]. – Text : visual // *Science Reports*. – 2020. – V. 10, № 1. – P. 13020.

269. The evolution of nitric oxide function: from reactivity in the prebiotic earth to examples of biological roles and therapeutic applications / M. Shepherd, D. Giordano, C. Verde, R.K. Poole. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2022. – V. 11, № 7. – P. 1222.

270. The fatigue-induced alteration in postural control is larger in hypobaric than in normobaric hypoxia / F. Degache, É. Serain, S. Roy [et al.]. – Text : visual // *Scientific Reports*. – 2020. – № 10. – P. 483.

271. The mitochondrial protease PARL is required for spermatogenesis / S. Schumacher, L. Klose, J. Lambertz [et al.]. – Text : visual // *Communications Biology*. – 2024. – V. 7, №1. – P. 44.

272. The role of antioxidants in the interplay between oxidative stress and senescence / A. Varesi, S. Chirumbolo, L.I.M. Campagnoli [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2022. – V. 11, № 7. – P. 1224.

273. The role of hypercapnia in acute respiratory failure / L. Morales-Quinteros, M. Camprubí-Rimblas, J. Bringué [et al.]. – Text : visual // *Intensive Care Medicine Experimental*. – 2019. – V. 25, № 7. – P. 39.

274. The role of hypoxia-inducible factors in cardiovascular diseases / B. Yu, X. Wang, Y. Song [et al.]. – Text : visual // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2022. – V. 238. – P. 108186.

275. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis / P. Sapieha, M. Sirinyan, D. Hamel [et al.]. – Text : visual // *Nature Medicine*. – 2008. – V. 14, № 10. – P. 1067-1076.

276. The succinate receptor SUCNR1 resides at the endoplasmic reticulum and relocates to the plasma membrane in hypoxic conditions / M. Sanchez, D. Hamel, E. Bajon [et al.]. – Text : visual // *Cells*. – 2022. – V. 11, № 14. – P. 2185.

277. TLR signaling adapter BCAP regulates inflammatory to reparatory macrophage transition by promoting histone lactylation / R.A. Irizarry-Caro, M.M. McDaniel, G.R. Overcast [et al.]. – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – V. 117, № 48. – P. 30628-30638.

278. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J.F. Turrens. – Text : visual // *Journal of Physiology*. – 2003. – V. 552, № 2. – P. 335-344.

279. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases / D.J. Stuehr, J. Santolini, Z.Q. Wang [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279, № 35. – P. 36167-36170.

280. Vanin, A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide / A.F. Vanin. – Text : visual // *Nitric Oxide*. – 2016. – V. 54. – P. 15-29.

281. Veselá, A. The role of carbon dioxide in free radical reactions of the organism / A. Veselá, J. Wilhelm. – Text : visual // *Physiological Research*. – 2002. – V. 51, № 4. – P. 335-339.

282. Weisshaar, D. Normbereiche von  $\alpha$ -HBDH, LDH, AP und LAP bei Messung mit substrat-optimierten Testansätzen / D. Weisshaar, E. Grossnoum, B. Faderl . – Text : visual // *Medizinische Welt*. – 1975. – Vol. 26, №9. – P. 387-390.

283. Wierońska, J.M. Nitric oxide-dependent pathways as critical factors in the consequences and recovery after brain ischemic hypoxia / J.M. Wierońska, P. Cieślik, L. Kalinowski. – Text : visual // *Biomolecules*. – 2021. – V. 11, № 8. – P. 1097.

284. Wu, P.Y. Long-term adverse effects of oxidative stress on rat epididymis and spermatozoa / P.Y. Wu, E. Scarlata, C. O'Flaherty. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2020. – V. 9, № 2. – P. 170.

285. Yang, Y. Succinylation links metabolism to protein functions / Y. Yang, G.E. Gibson. – Text : visual // *Neurochem Research*. – 2019. – V. 44, № 10. – P. 2346-2359.

286. Young, A. Lactate dehydrogenase supports lactate oxidation in mitochondria isolated from different mouse tissues / A. Young, C. Oldford, R.J. Mailloux [et al.]. – Text : visual // *Redox Biology*. – 2020. – № 328. – P. 101339.

287. Zun, Y.W. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation / Y.W. Zun, R. Hakanson. – Text : visual // *British Journal of Pharmacology*. – 1995. – V. 116. – P. 244-245.