

УДК 612.233+612.176:577.151.6

## **КОРРЕКЦИЯ ОКСИДАТИВНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА КРЫС С ПОМОЩЬЮ ИНТЕРВАЛЬНЫХ ГИПОКСИ-ГИПЕРОКСИЧЕСКИХ ТРЕНИРОВОК**

**Н.Н. Стешенко, О.А. Гончар, И.Н. Маньковская**

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев

Изучали влияние интервальных гипоксии-гипероксических тренировок (ИГГТ) на активность, экспрессию белка Mn-супероксиддисмутазы в митохондриях миокарда крыс после влияния острой гипоксии. Было показано, что использование ИГГТ приводит к снижению гиперактивации Mn-SOD и индуцирует экспрессию белка данного антиоксидантного фермента в митохондриях миокарда после действия острой гипоксии.

**Ключевые слова:** гипоксия, гипероксия, митохондрии, Mn-супероксиддисмутазы

**Введение.** В последнее время в медицинской и спортивной практике широко используются интервальные гипоксические тренировки (ИГТ) [2]. Эти методы позволяют ограничить усиление свободнорадикального окисления за счет активации собственных защитных систем организма путем периодического, небольшого по интенсивности прооксидантного сигнала [6]. Было показано, что длительные периоды гипоксии/нормоксии в сеансах ИГТ способны предупреждать повреждающие влияния экстремальных факторов – стресса, чрезмерных физических нагрузок, гипобарической гипоксии [2; 6].

В разработке наиболее эффективных режимов гипоксических тренировок особенный интерес привлекает введение в интервальные гипоксические тренировки гипероксической компоненты. Ряд авторов показали, что использование интервальных гипоксии-гипероксических тренировок (ИГГТ) приводило к формированию более выраженного защитного эффекта за меньший период времени в тканях печени, сердца и головного мозга по сравнению с классическими интервальными гипоксии-нормоксическими тренировками [6].

Известно, что в условиях гипоксии дыхательная цепь митохондрий является главным внутриклеточным источником генерации активных форм кислорода (АФК), чрезмерное образование которых ведет к нарушению метаболических процессов, структурных компонентов клеток, в том числе самих митохондрий и генома [8]. Вредному влиянию АФК противостоит мощная митохондриальная антиоксидантная система, ферментативные и неферментативные

компоненты которой работают на разных уровнях защиты. От состояния прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза митохондрий зависит резистентность клеточных структур к действию оксидативного стресса [4]. Однако, данных относительно влияния ИГГТ на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы митохондрий все еще недостаточно.

Задачей данного исследования стало изучение оксидативных нарушений митохондрий миокарда крыс при острой гипоксии и возможности их коррекции с помощью интервальных гипоксигипероксических тренировок.

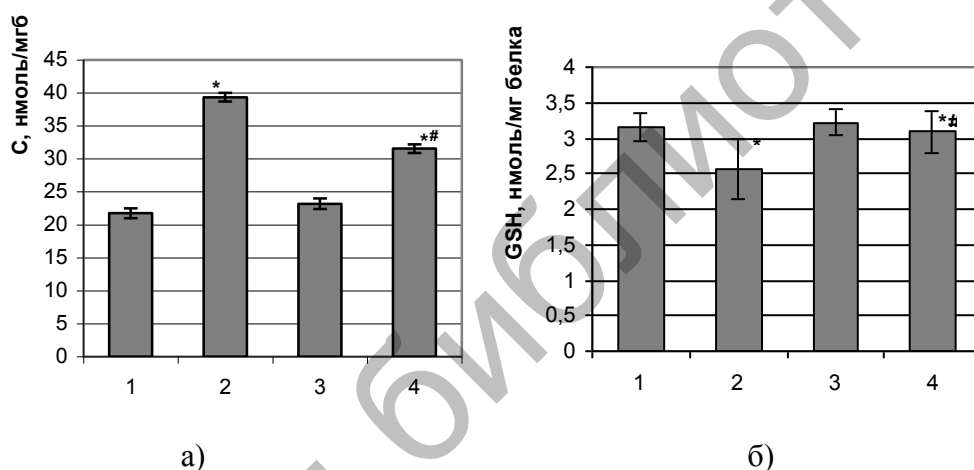
**Материал и методика** Эксперименты проводились на самцах крыс линии Вистар массой тела 230-250 г, которые пребывали на стандартном рационе. Перед исследованием животных разделили на группы: 1- контроль (нормоксия); 2- острая гипоксия (животные дышали гипоксической газовой смесью, которая содержала 7% O<sub>2</sub> в азоте на протяжении 45 мин) (ОГ); 3- интервальная гипоксигипероксическая тренировка (на протяжении 21 дня животные дышали гипоксической и умеренно гипероксической газовыми смесями по 60 минут каждый день, с чередованием интервалов гипоксии-гипероксии каждые 5 мин. Гипоксическая смесь содержала 10% O<sub>2</sub> в азоте, гипероксическая - 30% O<sub>2</sub> в азоте) (ИГГТ); 4- острая гипоксия после гипоксигипероксических тренировок (ИГГТ+ОГ).

Из тканей миокарда крыс выделяли митохондрии [12] и солюбилизировали митохондриальные белки в суспензии путем добавления 1% раствора Triton X-100. Степень окислительного повреждения митохондрий оценивали по содержанию активных продуктов 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК-АП) [7], антиоксидантную защиту – по активности Mn-супероксиддисмутазы (Mn-SOD) [13], глутатионпероксидазы (ГП) [3], глутатионредуктазы (ГР) [5]. Изменения уровня экспрессии белка Mn-SOD исследовали с помощью Western-blot анализа. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли по реакции с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой в присутствии 0,3 мМ НАДФН и 2 U/мл глутатионредуктазы [9]. Содержание белка определяли по методу Бредфорда.

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя *t*-критерий Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Согласно результатам исследований развитие острой гипоксической гипоксии у крыс сопровождалось значительными нарушениями прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза митохондрий миокарда. В частности, интенсификацией процессов ПОЛ, о чем свидетельствует повышение содержания ТБК-АП (рис. 1а) по сравнению с базовым уровнем в контрольной группе. Степень деструктивно-метаболических нарушений клеток при этих

условиях зависит от состояния ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем, которые в норме регулируют уровень активных радикалов кислорода. Большое значение в этих системах имеют Mn-SOD и глутатионовая система, которые действуют взаимосвязанно [4]. При острой гипоксии наблюдалось повышение активности Mn-SOD на 89% ( $p < 0.05$ ) (табл. 1), а также уровня экспрессии белка Mn-SOD на 14% ( $p < 0.05$ ) (рис. 2) относительно контрольной группы. Вероятно, индукция Mn-SOD в этих условиях является защитной реакцией на чрезмерную продукцию кислородных радикалов, которые могут активировать через разные сигнальные пути экспрессию антиоксидантных ферментов и Mn-SOD в частности. Одновременно в митохондриях миокарда наблюдалось снижение GSH на 19% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1б). Нарушение баланса GSH/GSSG в сторону накопления дисульфидов свидетельствует о сохранении окислительного стресса в этих субклеточных структурах при острой гипоксии [4]. Наблюдаемый в наших исследованиях дисбаланс глутатионового цикла в значительной мере обусловлен снижением активности ГР и ГП (табл. 1).



Р и с . 1 Влияние острой гипоксии и интервальных гипоксии-гипероксических тренировок на содержание ТБК-активных продуктов (а) и восстановленного глутатиона (б) в митохондриях миокарда крыс ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ ).

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; # -  $p < 0,05$  по сравнению с 2-й группой. Здесь, а также в рисунке 2: 1- контроль; 2 – острая гипоксия; 3- интервальная гипоксии-гипероксическая тренировка; 4 - интервальная гипоксии-гипероксическая тренировка + острая гипоксия

Известно, что инактивация пероксидных соединений глутатионпероксидазой существенно зависит от содержания супероксидрадикала, значительная концентрация которого может выступать в качестве ее ингибитора, а также изменений pH среды вследствие развития вызванного острой гипоксией ацидоза и истощения

глутатионового пула [14]. Похожие изменения в прооксидантно-антиоксидантном гомеостазе тканей при острой гипоксии отмечались также и в ряде других работ [1; 6].

Таблица 1

Активность антиоксидантных ферментов митохондрий миокарда крыс при гипоксии-гипероксических тренировках и острой гипоксии ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Группы	СОД, у.ед./мг белка	ГП, мкмоль GSH/мин/мг бел	ГР, мкмоль НАДФН/ мин/мг белка
Контроль	24,58 ± 1,32	551,19 ± 25,23	16,03 ± 0,88
ОГ	47,26 ± 1,71*	360,42 ± 16,57*	13,21 ± 1,02*
ИГГТ	25,16 ± 1,15 #	588,32 ± 35,28 #	15,66 ± 1,19
ИГГТ+ОГ	32,84 ± 2,18* #	499,36 ± 33,12* #	14,83 ± 1,28

Примечание. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; # -  $p < 0,05$  по сравнению с 2-й группой.

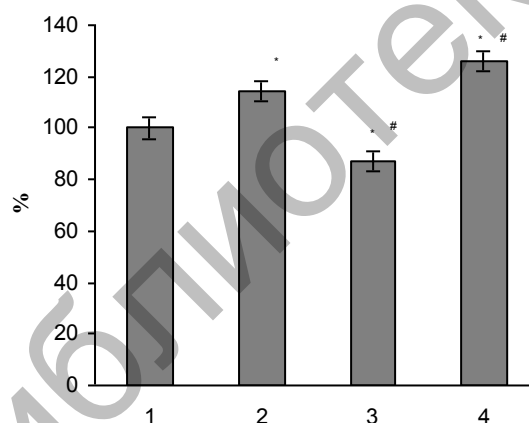


Рис. 2. Относительные показатели экспрессии белка Mn-SOD (уровень экспрессии данного белка у животных контрольной группы был принят за 100%) в митохондриях миокарда животных разных групп ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ ):  
\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; # -  $p < 0,05$  по сравнению с 2-й группой

После курса ИГГТ в митохондриях сердца активность Mn-SOD оставалась на уровне контроля (табл. 1). Сохранению глутатионового пула при таких адаптационных тренировках способствовало согласованное функционирование в глутатионовом редокс-цикле ГП и ГР. Последняя, как известно, регенерирует GSH из его окисленной формы, обеспечивая поддержку восстановленного потенциала глутатиона [11]. Полученные данные согласуются с работами других авторов, в которых отмечается, что интервальные гипоксии-гипероксические тренировки не приводят к повышению активности СОД и глутатионредуктазы в тканях мозга, а также экспрессии белков быстрого ответа HSP70 и HSP32, которые с одной стороны являются

маркерами повреждения, а с другой – исполняют защитную функцию от действия активных кислородных радикалов в клетке [5; 6].

Сохранение уровня ТБК-АП в пределах контроля свидетельствует о компенсации свободнорадикальных процессов со стороны антиоксидантной системы митохондрий сердца при условии длительного воздействия коротких периодов гипоксия/гипероксия (рис. 1а).

При действии острой гипоксической гипоксии на адаптированных животных, которые прошли длительный курс ИГГТ, в митохондриях миокарда наблюдалось снижение содержания ТБК-АП на 20% ( $p < 0,05$ ) и повышение количества GSH на 21% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1а,б) по сравнению с состоянием острой гипоксии. При этом, в митохондриях миокарда уровень экспрессии белка Mn-SOD не только восстанавливался к контрольным значениям, но и продолжал возрастать (рис. 2). Такие изменения сопровождалось снижением гиперактивации ферментативной активности Mn-SOD на 31% ( $p < 0,05$ ) на фоне повышения активности ГП на 25% ( $p < 0,05$ ), по сравнению со 2-й группой животных (табл. 1). Можно предположить, что АФК во время интервальных гипоксических тренировок инициируют сигнальные пути адаптивных ответов на гипоксический стресс, в частности влияют на ядерные транскрипционные факторы, такие как NIF-1, NF- $\kappa$ B, AP-1 и др., что приводит к активации компенсаторных каскадов, в том числе и синтеза защитных ферментов. Эти процессы обеспечивают более эффективное функционирование антиоксидантной защиты и повышение резистентности организма животных к гипоксии [10].

**Заключение.** Периодически действующая умеренная гипоксия-гипероксия в сеансах ИГГТ имела позитивное корригирующее влияние на процессы ПОЛ в митохондриях миокарда крыс при действии острой гипоксии. Эффективное функционирование ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы митохондрий у адаптированных к различному уровню кислорода животных приводило к усилению эндогенных уровней защиты, что способствовало повышению стойкости миокарда к воздействию чрезвычайных раздражителей.

### **Список литературы**

1. Гончар О.А., Розова Е.В. Влияние разных режимов интервальных гипоксических тренировок на морфологические характеристики и антиоксидантный статус тканей сердца и легких // Бюл. exper. биол. и мед. 2007. Т. 8. № 4. С. 216–221.
2. Колчинская А.З. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. М., Наука, 2003. 408 с.
3. Магазвіс В.М., Міхеев А.О., Роговий Ю.С. Визначення активності

- глутатионпероксидази // Сучасні методи експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії буковинської державної медичної академії. Чернівці. 2001. С. 13–15.
4. *Меньщикова Е.В., Зенков Н.К.* Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов// Усп. соврем. биологии. 1993. Т. 113, № 4. С. 442–453.
  5. *Путилина Ф.Е.* Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 272 с.
  6. *Сазонова Т.Г.* Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2005. Т. 91. С. 636–655.
  7. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. 1977. С. 66–68.
  8. *Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н.* Современные представления о патогенезе гипоксий. Классификация гипоксий и пусковые механизмы их развития // Соврем. наукоемк. техн. 2006. № 5. С. 23–27.
  9. *Anderson M.* Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples // *Methods Enzymol.* 1985. Vol. 113. P. 548-551.
  10. *Cadenas E.* Mitochondrial free radical production, antioxidant defenses and cell signaling // *The Handbook of Environmental Chemistry.* 2005. Vol. 2. P. 219–234.
  11. *Hayes J., McLellan L.* Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defense against oxidative stress // *Free Rad. Res.* 1999. Vol. 31. P. 273–300.
  12. *Mela L., Seitz S.* Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue // *Methods in Enzymology.* 1979. Vol. 55. P. 39–46.
  13. *Misra H., Fridovich I.* The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247, № 10. P. 3170–3175.
  14. *Sies H., Moss K.* A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver // *Eur.J. Biochem.* 1978. Vol. 8. P. 377–383.

**THE CORRECTION OF RAT MYOCARDIUM MITOCHONDRIAL  
OXIDATIVE DAMAGE BY INTERMITTENT  
HYPOXIA/HYPEROXIA TRAINING**

**N.M. Steshenko, O.A. Gonchar, I.N. Mankovska**

Bogomolets Institute of physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

The enzyme activity, protein expression of Mn-superoxide dismutase in myocardial mitochondria of rats exposed to acute hypoxia after intermittent hypoxia/hyperoxia training (ИНТ) were studied. It has been shown that ИНТ inhibited the hyperactivation of Mn-SOD activity and induced the protein expression of this antioxidant enzyme in myocardial mitochondria after acute hypoxia action.

**Keywords:** *hypoxia, hyperoxia, mitochondria, Mn-superoxide dismutase.*

*Об авторах:*

СТЕШЕНКО Николай Николаевич—кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела по изучению гипоксических состояний, Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, 01024, Киев-24, ул. Богомольца, д. 4, e-mail: steshenkon@mail.ru

ГОНЧАР Ольга Александровна—кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела по изучению гипоксических состояний, Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, 01024, Киев-24, ул. Богомольца, д. 4, e-mail: ogonchar@yandex.ru

МАНЬКОВСКАЯ Ирина Никитична—доктор медицинских наук, заведующая отделом по изучению гипоксических состояний, Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, 01024, Киев-24, ул. Богомольца, д. 4, e-mail: mankovsk@biph.kiev.ua