УДК 612.233+612.176:577.151.6

ВПЛИВ ГІПОКСИЧНО-ГІПЕРОКСИЧНИХ ТРЕНУВАНЬ НА ПРОЦЕСИ ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ТА АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА ЩУРІВ ЗА УМОВ ГОСТРОЇ ГІПОКСІЇ

©М.М. Стешенко, В.І. Носарь, О.О. Гончар, І.М. Маньковська

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ

РЕЗЮМЕ. Досліджували вплив інтервальних гіпоксично/гіпероксичних тренувань (ІГГТ) на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів, активність та рівень експресії білка антиоксидантного ферменту Mn-супероксиддисмутази, процеси дихання та окисного фосфорилювання в мітохондріях міокарда щурів після гострої гіпоксії. Було показано, що помірна гіпоксія/гіпероксія в сеансах ІГГТ мала позитивний корегуючий ефект на прооксидантно-антиоксидантний баланс, посилювала ендогенний антиоксидантний захист, сприяла більш ефективному функціонуванню дихального ланцюга мітохондрій та підвищувала стійкість мітохондрій міокарда до дії гострої гіпоксії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мітохондрії, гіпоксія, інтервальні тренування, окисне фосфорилювання, Mn-супероксиддисмутаза.

Вступ. Практична медицина постійно постає перед проблемою захисту організму від порушень, що викликаються та супроводжуються недостатнім постачанням кисню. Гіпоксія є ключовим фактором у патогенезі більшості гострих та хронічних захворювань і є універсальним патологічним процесом. Ключову роль у відповіді клітини на гіпоксичний вплив відіграють мітохондрії, що є як основним споживачем кисню, так і головним джерелом генерації активних форм кисню (АФК) в клітині [8, 15]. Відомо, що порушення функціонування мітохондрій за умов гіпоксії призводить до складних перебудов у клітинному гомеостазі та запускає цілий ряд сигнальних і регуляторних шляхів, викликає енергетичний дефіцит, індукує розвиток окисного стресу та активує механізми клітинної смерті [4, 8]. Розуміння молекулярних механізмів формування мітохондріальної дисфункції за умов нестачі кисню відкриває нові перспективи у розробці засобів профілактики та корекції наслідків гіпоксичних пошкоджень міокарда.

В наш час пропонується багато стратегій прекондиціювання з ціллю протекції мітохондрій, що модулюють їх дихання, продукцію АТФ, транспорт іонів та ін. Однак особливу увагу привертають методи, що дозволяють обмежувати надмірне посилення вільнорадикальних процесів за рахунок активації власних ендогенних захисних систем організму, зокрема такі, як інтервальні гіпоксичні тренування [1]. Особливий інтерес привертає введення в інтервальне гіпоксичне тренування гіпероксичної компоненти. Рядом авторів було показано, що використання інтервальних гіпоксично-гіпероксичних тренувань приводило до формування більш вираженого захисного ефекту за коротший час в тканинах печінки, серця і головного мозку порівняно з класичними інтервальними гіпоксично-нормоксичними тренуваннями [2].

Мета дослідження – вивчення можливості корекції за допомогою інтервальних гіпоксично-гіпероксичних тренувань мітохондріальної дисфункції, що виникає при гострій гіпоксичній гіпоксії.

Матеріал і методи дослідження. Експерименти проведено на щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 230-250 г, які знаходились на стандартному раціоні. Перед дослідженням тварин розподілили на групи: 1 – контроль (нормоксія); 2 – гостра гіпоксія (тварини дихали гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 7 % O_2 в азоті протягом 45 хвилин) (ГГ); 3 – інтервальне гіпоксично-гіпероксичне тренування (протягом 21 днів тварини дихали гіпоксичною та помірно гіпероксичною газовими сумішами по 60 хв щоденно, з чергуванням інтервалів гіпоксії-гіпероксії кожні 5 хв. Гіпоксична суміш містила 10 % O_2 в азоті, гіпероксична – 30 % O_2 в азоті) (ІГГТ); 4 – гостра гіпоксія після гіпоксично-гіпероксичних тренувань (ІГГТ+ГГ).

З тканин міокарда щурів мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [12]. Ступінь оксидативного пошкодження мітохондрій оцінювали за вмістом активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [3], антиоксидантний захист – за активністю Mn-супероксиддисмутази (Mn-СОД) [13]. Функціональний стан мітохондрій досліджували полярографічним методом за Ченсом та Вільямсом [6]. Середовище інкубації містило: 225 мМ манітол, 75 мМ сахарозу, 20 мМ Tris, 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ фосфат, pH 7,4. Як субстрати окиснення використовували 0,35 мМ сукцинат натрію, 3мМ глутамат натрію, 2,5мМ малат натрію. За отриманими полярограмами розраховували показники: швидкість дихання в

активному стані (V_3), контрольоване дихання мітохондрій (V_4), дихальний контроль за Ченсом (V_3/V_4) та коефіцієнт ефективності фосфорилювання АДФ/О за Estabrook [9]. Вміст білка визначали за методом Бредфорда [5]. Отримані результати обробляли статистично, використовуючи t-критерій Стьюдента.

Результати й обговорення. Відомо, що нестача кисню призводить до значних змін в прооксидантно-антиоксидантному балансі мітохондрій [2]. Згідно з нашими дослідженнями, гостра гіпоксія викликала підвищення вмісту ТБК-активних продуктів в мітохондріях міокарда щурів у 1,8 раза ($p<0,05$) порівняно з контролем (рис. 1). Інтенсифікація процесів ПОЛ свідчить про надмірне утворення АФК, можливо, за рахунок неповного відновлення кисню в дихальному ланцюзі мітохондрій та нескомпенсованість перекисних процесів з боку антиоксидантної системи. Ключову роль в антиоксидантному захисті відіграє Mn-СОД, що діє у взаємозв'язку з іншими антиоксидантними ферментами та відповідає за перетворення супероксидрадикалу в перекис водню [7, 8]. Як відмічалося рядом дослідників, значне зниження активності та експресії білка Mn-СОД призводить до порушень у функціонуванні мітохондрій, зокрема процесів окисного фосфорилювання, накопичення оксидативних пошкоджень, підвищення чутливості до гіпоксії та інших стресорних впливів, що веде до активації апоптичних процесів, дистрофічних змін тканин, та загибелі тварин [11]. У нашій роботі за умов гострої гіпоксії відмічалось підвищення активності Mn-СОД у 1,9 раза ($p<0,05$) відносно контролю (рис. 1), а також спостерігалася тенденція до зростання експресії білка даного ферменту. Таку реакцію можна пояснити компенсаторним підвищенням активності Mn-СОД у відповідь на посилену продукцію супероксидрадикалу. На подібні зміни у прооксидантно-антиоксидантній системі за умов гострої гіпоксії вказують і інші дослідники, відмічаючи підвищення активності Mn-СОД, що корелює з ростом рівня МДА [14].

Відомо, що АФК здатні ініціювати сигнальні шляхи адаптивних відповідей серця на гіпоксичний стрес, зокрема впливати на ядерні фактори транскрипції, такі як HIF-1, NF–kB, AP-1 та ін., що приводить до активації компенсаторних каскадів, у тому числі і синтез антиоксидантних ферментів [10, 15]. Ймовірно, індукція Mn-СОД за даних умов є захисною реакцією на посилене утворення АФК в мітохондріях міокарда під час дії гострої гіпоксії. Крім того, відомо, що Mn-СОД як швидко мобілізуюча ізоформа бере участь у попередженні гострого оксидативного стресу, на відміну від Cu,Zn-СОД, яка відіграє більше значення у адаптації до більш довготривалих патологічних процесів [14].

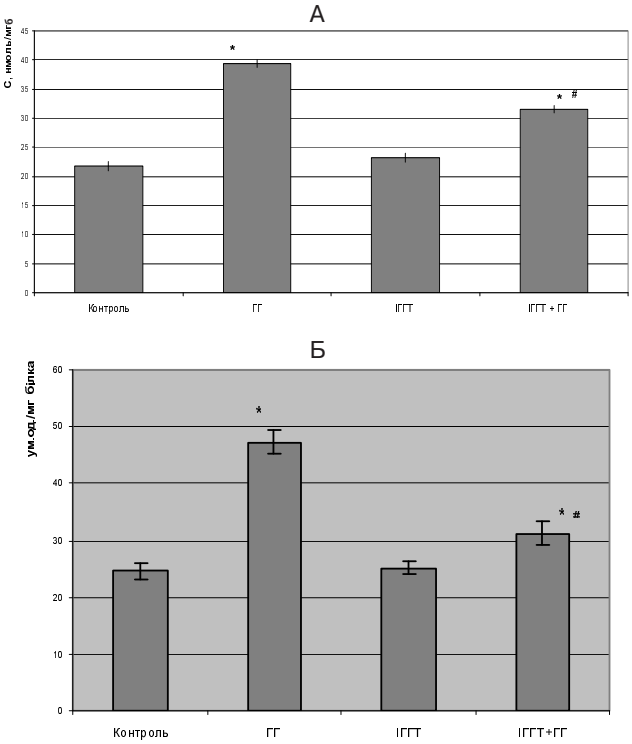

Рис. 1. Вплив гострої гіпоксії (ГГ) та інтервальних гіпоксично-гіпероксичних тренувань (ІГГТ) на вміст ТБК-активних продуктів (А) та активність Mn-СОД (Б) в мітохондріях міокарда щурів (M±m, n =8). * – $p<0,05$ відносно контролю; # – $p<0,05$ відносно до стану гострої гіпоксії (ГГ).

За умов гострої гіпоксії спостерігалося підвищення швидкості дихання мітохондрій в активному стані порівняно з контролем за умов використання в якості субстрату сукцинату (V_3) на 16 % ($p<0,05$), в той час як при використанні глутамату з малатом цей показник знижувався на 15 % ($p<0,05$). Ефективність використання кисню для синтезу макроергів, про що свідчить значення АДФ/О, знижувалось для сукцинату на 15 % ($p < 0,05$) (табл. 1). Це може бути свідченням більш напруженого енергозабезпечення та меншої економічності процесів окисного фосфорилювання за цих умов.

Гіпоксично-гіпероксичні тренування не призводили до значних змін у прооксидантно-антоксидантній системі мітохондрій міокарда. Так, вміст ТБК-активних продуктів та активність Mn-СОД залишалися на рівні контролю. Отримані дані узгоджуються з роботами інших авторів, в яких вказується, що інтервальні гіпоксично-гіпероксичні тренування не призводили до збільшення активності СОД, каталази та глутатіонре-

дуктази в тканинах міокарда та мозку, а також експресії білків швидкої відповіді HSP70 і HSP32, які, з одного боку, є маркерами пошкодження, а з іншої – виконують захисну функцію від дії активних кисневих радикалів у клітині [2]. Необхідно відмітити, що після курсу ІГГТ рівень експресії Mn-СОД дещо знижувався.

Після сеансів ІГГТ в мітохондріях серця за умов окиснення сукцинату спостерігалася тенденція до зниження швидкості споживання кисню в активному стані та зростання коефіцієнта АДФ/О, відмічалася збалансованість між процесами окиснення та фосфорилювання, порівняно зі станом гострої гіпоксії (табл. 1).

При дії гострої гіпоксії у тварин, що пройшли тривалий курс ІГГТ, в мітохондріях міокарда спостерігалося зменшення вмісту ТБК-активних продуктів на 20 % ($p<0,05$), а також зниження гіперактивації Mn-СОД на 31 % ($p<0,05$) (рис. 1). Експресія Mn-СОД не тільки відновлювалася до контрольних значень, але й продовжувала зростати, що, ймовірно, приводило до підвищення ефективності роботи антиоксидантної системи та її резервних можливостей.

У цій групі тварин спостерігалося зниження швидкості дихання мітохондрій в активному стані при використанні в якості субстрату окиснення сукцинату V_3 – на 19 % ($p < 0,05$) порівняно з станом гострої гіпоксії, показник АДФ/О підвищувався на 16 % ($p < 0,05$), та наближався до контрольних значень (табл. 1). При окисненні глутамату з малатом спостерігалося зростання швидкості дихання мітохондрій в активному стані V_3 – на 32 % ($p < 0,05$), коефіцієнт АДФ/О демонстрував тенденцію до зростання, а показник дихального контролю V_3/V_4 підвищувався на 21 % (табл. 1). При дії гострої гіпоксії після сеансів ІГГТ було виявлено значну протекторну роль адаптаційних механізмів енергозабезпечення, індукованих сеансами ІГГТ. Ці зміни перидусім проявлялися у підвищенні ефективності фосфорилювання та підвищенні спряженості процесів окиснення та фосфорилювання при застосуванні НАД-залежних субстратів, тобто в підвищенні ефективності регуляції дихання мітохондрій.

Висновок. Помірна гіпоксія-гіпероксія має позитивний корегуючий вплив на процеси ПОЛ у мітохондріях міокарда щурів, сприяє більш ефективному функціонуванню дихального ланцюга мітохондрій та формуванню ендогенних антиоксидантних рівнів захисту, що призводило до підвищення стійкості міокарда за умов дії надзвичайного подразника.

Перспективи подальших досліджень. На сьогодні актуальним залишається пошук нефармакологічних засобів профілактики та корекції негативних наслідків порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу міокарда за умов гіпоксії різного генезу шляхом активації власних ендогенних захисних систем організму. Тому перспективним видається пошук як більш ефективних режимів інтервальних гіпоксично-гепероксичних тренувань, так і дослідження загальних молекулярних механізмів формування адаптивних відповідей на періоди помірної гіпоксії/реоксигенації, що дасть змогу виявити ключові молекулярні ланки адаптивних шляхів та здійснювати вплив на них.

Таблиця 1. Показники окисного фосфорилювання в мітохондріях міокарда щурів за умов інтервальних гіпоксично-гіпероксичних тренувань (ІГГТ) та гострої гіпоксії (ГГ) (M±m, n =10)

Групи	V_3, нгатом О/хв/мгб	V_4, нгатом О/хв/мгб	V_3 / V_4	АДФ/О
субстрат окиснення сукцинат				
Контроль	76,00 ± 2,98	34,56 ± 2,67	2,22 ± 0,12	1,42 ± 0,09
ГГ	88,40 ± 3,47*	34,52 ± 2,90	2,40 ± 0,10	1,21 ± 0,10*
ІГГТ	68,26 ± 3,34*	27,30 ± 2,80*	2,43 ± 0,11	1,53 ± 0,09
ІГГТ+ГГ	71,30 ± 3,12 #	29,71 ± 2,66	2,38 ± 0,12	1,44 ± 0,11
субстрат окиснення глутамат+малат				
Контроль	65,54 ± 3,18	20,47 ± 2,77	3,24 ± 0,13	2,32 ± 0,11
ГГ	55,00 ± 3,64*	18,33 ± 2,87	3,08 ± 0,11	2,04 ± 0,13
ІГГТ	79,86 ± 3,84*	21,07 ± 2,57	3,82 ± 0,12*	2,52 ± 0,09
ІГГТ+ГГ	81,34 ± 3,08* #	20,84 ± 2,14	3,90 ± 0,11*	2,45 ± 0,10

Примітки: * – $p<0,05$ відносно контролю; # – $p<0,05$ відносно до стану гострої гіпоксії (ГГ).

ЛІТЕРАТУРА

1. Колчинская А.З., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. – М.: Наука, 2003. – 408 с.

2. Роль активных форм кислорода и редокс–сигнализации при адаптации к изменению содержания кислорода / Т.Г. Сазонтова, Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова и др. / Фізіол журн. – 2008. – Т. 54, № 2. – С. 18–32.

3. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – 1977. – С. 66–68.

4. Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Константинов Ю.М. Механизмы участия митохондрий в развитии патологических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – Т. 51, № 5. – С. 332–336.

5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

6. Chance B., Williams Y. The respiratory chain and oxidative phosphorilation // Adv.Enzymol. – 1956. – Vol. 17. – P. 65–134.

7. Derick Han, Fernando Antunes, Francesca Daneri Mitochondrial superoxide anion production and release into intermembrane space // Methods in Enzymology. – 2002. – Vol. 349. – P. 271–280.

8. Enrique Cadenas, Alberto Boveris. Mitochondrial free radical production, antioxidant defenses and cell signaling // The Handbook of Environmental Chemistry. – 2005. – Vol. 2, Part O. – P. 219–234.

9. Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios // Methods Enzymol. – 1967. – Vol. 10. – P.41–47.

10. Fabio Di Lisa, Marcella Canton, Roberta Menabo. Mitochondria and cardioprotection // Heart Fail Rev. – 2007. – Vol. 12. – P. 249–260.

11. Jason E. Kokoszka, Pinar Coskun, Luke A. Esposito Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2(+/–) mouse results in the age–related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis // PNAS. – 2001. – Vol. 98, No. 5. – P. 2278–2283.

12. Leena Mela, Steven Seitz. 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. Muzakova V., Kandar R., Vojtisek P. Selective antioxidant enzymes during ischemia/reperfusion in myocardial infarction // Physiol. Res. – 2000. – Vol. 49. – P. 315–322.

15. Skulachev V.P. New data on biochemical mechanism of programmed senescence of organisms and antioxidant defense of mitochondria // Biochemistry (Moscow). – 2009. – Vol. 74, No.12. – P. 1400–1403.

INFLUENCE OF HYPOXIA AND HYPEROXIA TRAININGS ON ENERGY METABOLISM AND ANTIOXIDATIVE STATE OF MYOCARDIUM MITOCHONDRIA EXPOSED TO ACUTE HYPOXIA

M.M. Steshenko, V.I. Nosar, O.O. Honchar, I.M. Mankovska

Institute of Physiology by O.O. Bohomolets NAS of Ukraine, Kyiv

SUMMARY. The intensity of lipid peroxidation, energy metabolism, activity and protein expression of antioxidant enzyme – Mn-superoxide dismutase have been studied in myocardium mitochondria of rats exposed to acute hypoxia after intermittent hypoxia/hyperoxia (IHH). It has been shown that moderate IHH have the positive influence on mitochondrial prooxidative and antioxidative balance, stimulates the endogenous antioxidative defense, promote more effectivily functioning of the respiratory chain and enhances the resistance of the myocardium mitochondria to acute hypoxia action.

KEY WORDS: mitochondria, hypoxia, intermittent trainings, oxidative phosphorilation, Mn-superoxide dismutase.