



УДК 612.233:612.176:577.151.6

© 2009

О. О. Гончар

## Участь глутатіонової редокс-системи мітохондрій у формуванні компенсаторно-адаптивної відповіді на гіпоксію/реоксигенацію

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. Ф. Сагачем)

*Показано, що довготривала переривчаста гіпоксія (дихання гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 12% O<sub>2</sub> в азоті, протягом 5 хв з 15-хвилинними нормоксичними інтервалами 65 хв щодоби протягом 3 тижнів) призводить до зниження в мітохондріях печінки шурів продукції супероксиданіона, пероксиду водню, а також вмісту вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів після дії гострого іммобілізаційного стресу. Встановлено, що підвищена активність та погоджена дія Mn-супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та НАДФ-залежної ізоцитратдегідрогенази сприяють збереженню глутатіонового пулу мітохондрій, а також безпосередньо беруть участь у формуванні адаптаційних реакцій до гострого стресу у тварин, тренуваних за умов тривалої дії гіпоксії/реоксигенації.*

Відомо, що переривчаста гіпоксія може ефективно стимулювати різні метаболічні процеси, і цей феномен широко застосовується в медичній та спортивній практиці [1]. Багаторазові короткі експозиції гіпоксії/реоксигенації в процесі переривчастої гіпоксії порівнюють зі станом “гіпоксичного прекодиціювання”, протекторний ефект якого відмічався рядом дослідників у різних тканинах і розглядався як одна з форм адаптації до наступної дії екстремальних чинників — ішемії, стресу, фізичного навантаження [2]. Показано, що адаптація до переривчастої гіпоксії сприяє зростанню мітохондріальних популяцій у тканинах печінки та мозку, запобігає виснаженню мітохондріальної ДНК, підвищує ефективність окисного фосфорилування шляхом компенсаторної перебудови активності ферментів субстратних ділянок дихального ланцюга мітохондрій [1–3]. Однак більш тонкі механізми, що обумовлюють захисні та регуляторні ефекти переривчастої гіпоксії в мітохондріях, ще остаточно не з'ясовано.

Зниження доставки кисню за умов гіпоксії та подальше відновлення його вмісту за умов реоксигенації в процесі переривчастої гіпоксії спричиняє ряд функціонально-метаболічних

перебудов, серед яких важливу роль відіграє активація вільнорадикальних процесів [2]. Вважається, що саме цей механізм виконує роль тригера, який здатен запускати каскад внутрішньоклітинної редокс-сигналізації з наступною активацією редокс-чутливих факторів транскрипції та генів, що контролюють синтез захисних компонентів [4]. Значну роль в редокс-регуляції відіграє процес модифікації сульфгідрильних груп у сигнальних молекулах, в якому беруть участь, з одного боку, активні форми кисню (АФК), а з іншого — такі тіолвмісні сполуки, як глутатіон, глутаредоксини, тіоредоксини та пероксиредоксини [2]. Висока редокс-активність глутатіону при одночасній стійкості до окиснення киснем, значна концентрація в клітині та можливість зберігати свій відновлений стан роблять його важливим внутрішньоклітинним редокс-буфером [5]. Як антиоксидант глутатіон відіграє ключову роль у захисті клітинних структур від окиснювального стресу, виступаючи донором електронів для ферменту глутатіонпероксидази. Ще одна важлива функція глутатіону пов'язана з утворенням змішаних дисульфідів з білками, що може бути додатковим елементом регуляції біологічних процесів [5, 6]. Однак питання щодо ролі мітохондріальної глутатіонової редокс-системи у формуванні компенсаторно-приспосувальних реакцій у процесі адаптації вивчені недостатньо.

Метою дослідження стало вивчення участі глутатіону, ферментів глутатіонового рециклу, а також ферментів-донорів НАДФН мітохондрій печінки у формуванні адаптаційних реакцій до гострого стресу у тварин, тренуваних за умов тривалої дії гіпоксії/реоксигенації.

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 200–220 г, які були розділені на чотири групи (по шість у кожній). I групу (контроль) складали тварини, які знаходились у звичайних умовах. Тварин II групи піддавали дії гострого іммобілізаційного стресу (ГІС). Щурів іммобілізували у пластикових пеналах з жорсткою фіксацією протягом 6 год. Тварин III групи піддавали дії переривчастої гіпоксії (ПГ). Щури дихали гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 12%  $O_2$  в азоті, протягом 5 хв з 15-хвилинними нормоксичними інтервалами (реоксигенація). Чергування періодів гіпоксії/реоксигенація тривали 65 хв щодоби протягом 3 тижнів. У IV групі тварин піддавали дії 6-годинного іммобілізаційного стресу на першу добу після 3-тижневих гіпоксичних тренувань (ПГ + ГІС). Тварин декапітували під легким ефірним наркозом зразу після експерименту.

Мітохондрії з гомогенатів печінки отримували методом диференціального центрифугування згідно з D. Jonson, H. Lardy (1967). Продукцію активних метаболітів кисню — супероксиданіона ( $O_2^{\cdot-}$ ) і пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) визначали за G. Drossos зі співавт. (1995) та Huwiler, Kohler (1984). Вміст вторинних продуктів ПОЛ, які реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти), розраховували за J. Buege, S. Aust (1978). Активність Mn-SOD (КФ 1.15.1.1) у мітохондріях печінки досліджували за H. Misra, I. Fridovich (1972), глутатіонредуктази (ГР) (КФ1.6.4.2) — за зменшенням вмісту НАДФН за 1 хв на 1 мг білка при довжині хвилі 340 нм згідно з [7], глутатіонпероксидази (ГП) (КФ1.11.1.9) — за вмістом відновленого глутатіону на 1 мг білка при довжині хвилі 412 нм згідно з J. T. Rotruck зі співавт. (1973), глутатіон-S-трансферази (ГТ) (КФ1.5.1.18) — за методом M. Warholm зі співавт. (1985), який ґрунтується на ферментативному зв'язуванні глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом з утворенням кон'югатів, що мають максимум світлопоглинання при довжині хвилі 340 нм, НАДФ-ізоцитратдегідрогенази (НАДФ-ІЦДГ) (КФ1.1.1.42) — за швидкістю відновлення НАДФ у середовищі 50 мМ *трис*-HCl буферу (pH 7,8), що містило 1,5 мМ ізоцитрату, 0,25 мМ НАДФ [7].

Кількість загального глутатіону визначали за реакцією з 5,5-дитіо-біс-(2-нітробензойною) кислотою у присутності 0,3 мМ НАДФН та 2 U/мл глутатіонредуктази. Окиснений

глутатіон (GSSG) вивчали в присутності 2-вінілпіридину [8]. Одержані дані використовували для розрахунку вмісту відновленого глутатіону (GSH) та величини його відношення до окисненого. Концентрацію білка визначали за методом О. Н. Lowry зі співавт. (1951).

Результати досліджень обробляли статистично за допомогою програми "Origine, 7.0". Вірогідність розходжень між групами порівняння визначали методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test).

Відомо, що за умов гіпоксії/реоксигенації мітохондрії є одним з основних джерел утворення вільних радикалів [3]. У цих органелах виявлено декілька функціональних комплексів, що продукують АФК, але компоненти початкової та середньої частин дихального ланцюга найбільш активні в цьому відношенні [2, 3]. Гіперпродукція високореакційних кисневих метаболітів здатна пошкоджувати будь-які макромолекули (білки, ДНК, ліпіди), однак наявність ефективного антиоксидантного захисту дозволяє підтримувати концентрацію оксидантів на безпечному рівні [2, 9].

Як показали результати досліджень, тривала помірна гіпоксія/реоксигенація не викликала значних змін у прооксидантній системі мітохондрій. Концентрація  $O_2^-$ , а також вміст ТБК-активних продуктів залишалися на контрольному рівні (табл. 1). Відомо, що більша частка супероксидного радикала, який генерується мітохондріями, вивільняється в мітохондріальній матрикс, де перетворюється до пероксиду водню за участю міжмембранної Mn-SOD [6]. Висока активність Mn-SOD, що реєструвалася в мітохондріях за даних експериментальних умов, відповідала швидкому рівню дисмутації  $O_2^-$  і, відповідно, зростанню кількості  $H_2O_2$  (див. табл. 1). У нормі клітини не зазнають токсичних ефектів пероксидних сполук завдяки антиоксидантним системам, які відповідають за розпад  $H_2O_2$ . До цих систем належать ферменти окисно-відновних циклів глутатіону та тіоредоксину, каталаза та ін. [10]. Оскільки в мітохондріях багатьох клітин остання відсутня, то ГП та ГТ відіграють провідну роль у метаболізмі пероксидів [5, 10]. Згідно з результатами досліджень, зростання кількості  $H_2O_2$  за умов адаптації до переривчастої гіпоксії не призводило до інтенсифікації процесів пероксидного окиснення ліпідів у мембранних структурах мітохондрій, що свідчить про погоджену дію антипероксидних ферментів та/або швидку дифузії  $H_2O_2$  із мітохондрій у цитозоль [5]. В останні роки з'явилися переконливі свідчення на користь участі  $H_2O_2$  в регуляції різних клітинних процесів, модуляції активності сигнальних молекул, у тому числі фосфатаз, кіназ, факторів транскрипції тощо [11]. Однак, на відміну від деяких інших внутрішньоклітинних медіаторів, наприклад кальцію,  $H_2O_2$  легко проникає крізь мембранні структури і тому не може запасатися. Отже, сигнали, які  $H_2O_2$  здатна переносити, можуть контролюватися на рівні синтезу — розпаду останнього, що свідчить про вагомий роль у цих процесах ферментів окисно-відновного циклу глутатіону [9, 11].

Таблиця 1. Активність ферменту Mn-SOD та показники прооксидантної системи мітохондрій печінки щурів за умов переривчастої гіпоксії (ПГ) та гострого іммобілізаційного стресу (ГІС) ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Група	ТБК-активні продукти, нМ/мг білка	$O_2^-$ , нМ/(хв · мг білка)	$H_2O_2$ , пМ/мг білка	Mn-SOD, ум. од./мг білка
I, контроль	1,39 ± 0,08	1,11 ± 0,04	1,89 ± 0,12	3,62 ± 0,17
II, ГІС	1,93 ± 0,10*	1,66 ± 0,06*	2,94 ± 0,28*	2,89 ± 0,18*
III, ПГ	1,46 ± 0,05	1,17 ± 0,03	2,41 ± 0,28*	4,65 ± 0,18*
IV, ПГ + ГІС	1,65 ± 0,05**,**	1,32 ± 0,05**,**	2,76 ± 0,26*	4,83 ± 0,16**,**

Примітка. Тут і в табл. 2 і 3 \* —  $p < 0,05$  відносно контролю; \*\* —  $p < 0,05$  відносно гострого іммобілізаційного стресу.

Один із шляхів, за яким  $H_2O_2$ , як і інші АФК, бере участь у регуляції — це зміни внутрішньоклітинного редокс-статусу за рахунок окиснення молекул глутатіону. Потенційно такі зміни можуть неспецифічно впливати на перебіг більшості метаболічних реакцій, які задіяні в процесі адаптаційних перебудов [6].

У адаптованих до гіпоксії тварин відмічалось збереження кількості загального глутатіону при тенденції до зростання його окисненої форми, що впливає на співвідношення GSH/GSSG (табл. 2). Оскільки GSSG не може бути експортовано з мітохондрій до цитозолу, мітохондріальна НАДФН залишається важливим відновним еквівалентом у регенерації GSH за допомогою ГР [4]. Припускається, що в мітохондріях з усіх ферментів-донорів НАДФН ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ) належить найвагоміша роль [12]. В останні роки встановлено значне зростання продукції АФК, фрагментація ДНК, інтенсифікація процесів ПОЛ, падіння рівня АТФ у мітохондріях при зниженні експресії ІЦДГ [13]. Однак участь мітохондріальної ІЦДГ, яка каталізує декарбоксилювання ізоцитрату в  $\alpha$ -кетоглутарат із конкурентною продукцією НАДФН [5, 12], за умов переривчастої гіпоксії залишається нез'ясованою.

Згідно з одержаними результатами, у мітохондріях тварин, адаптованих до переривчастої гіпоксії, підвищення активності ГР (на 9%,  $p < 0,05$ ) та ІЦДГ (на 18%,  $p < 0,05$ ) сприяє скоординованим діям ферментів глутатіонового редокс-циклу і, як наслідок, збереженню глутатіонового пулу (табл. 2, 3). Ці дані узгоджуються з фактами відносно зрушення реакцій анаеробного гліколізу в бік процесів аеробного метаболізму, зі стимулюванням активності окисних ферментів в умовах інтервальної гіпоксії та акліматизації до високогір'я [1]. Позитивна кореляція між вмістом ТБК-активних продуктів та активністю ІЦДГ ( $r = 0,98$ ), ГР ( $r = 0,86$ ), ГП ( $r = 0,67$ ) за умов тривалої дії гіпоксії/реоксигенації свідчить про активне включення глутатіонових, а також НАДФ-генеруючих ферментів у процеси захисту від окиснювального стресу.

Для оцінки ефективності гіпоксичної адаптації вивчали реакцію глутатіонової системи мітохондрій на гострий стресорний подразник. Імобілізація викликала зростання продукції супероксиданіона на 49% ( $p < 0,05$ ),  $H_2O_2$  на 56% ( $p < 0,05$ ), вмісту ТБК-активних

Таблиця 2. Вплив переривчастої гіпоксії (ПГ) та гострого іммобілізаційного стресу (ГІС) на стан глутатіонового пулу в мітохондріях печінки щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Група	t-GSH, нМ/мг білка	GSSG, нМ/мг білка	GSH, нМ/мг білка	GSH/GSSG
I, контроль	5,27 $\pm$ 0,37	0,23 $\pm$ 0,12	4,82 $\pm$ 0,29	20,92 $\pm$ 0,67
II, ГІС	4,73 $\pm$ 0,20	0,39 $\pm$ 0,16*	3,95 $\pm$ 0,19*	10,14 $\pm$ 0,61*
III, ПГ	5,14 $\pm$ 0,47	0,26 $\pm$ 0,01	4,63 $\pm$ 0,46	17,86 $\pm$ 0,92*
IV, ПГ + ГІС	4,97 $\pm$ 0,24	0,31 $\pm$ 0,02*,**	4,35 $\pm$ 0,22	14,05 $\pm$ 0,58*,**

Таблиця 3. Вплив переривчастої гіпоксії (ПГ) та гострого іммобілізаційного стресу (ГІС) на активність глутатіонзалежних і НАДФ<sup>+</sup>-генеруючих ферментів у мітохондріях печінки щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Група	ГР, мкМ НАДФН/(хв · мг білка)	ГП, мкМ GSH/(хв · мг білка)	ГТ, мкМ/(хв · мг білка)	НАДФ-ІЦДГ, мкМ НАДФН/(хв · мг білка)
I, контроль	20,07 $\pm$ 0,47	3,11 $\pm$ 0,13	11,50 $\pm$ 0,64	19,90 $\pm$ 0,61
II, ГІС	17,16 $\pm$ 1,07*	2,42 $\pm$ 0,15*	13,28 $\pm$ 0,57*	18,70 $\pm$ 0,56
III, ПГ	21,88 $\pm$ 0,42*	3,24 $\pm$ 0,14	10,12 $\pm$ 0,81	23,51 $\pm$ 0,78*
IV, ПГ + ГІС	19,33 $\pm$ 0,55**	3,06 $\pm$ 0,12**	10,70 $\pm$ 1,01**	21,47 $\pm$ 1,04*,**

продуктів на 39% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем (див. табл. 1). При цьому підвищувався рівень окисненого глутатіону на 69% ( $p < 0,05$ ) та знижувався вміст відновленого глутатіону на 18% ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 2). Зрушення балансу GSH/GSSG у бік накопичення окисненого глутатіону свідчить про збереження в мітохондріях окиснювальних процесів та зниження відновлювального потенціалу глутатіону. Виявлену у тварин цієї групи активацію ГТ на тлі зниження активності ГП можна розглядати як компенсаторну реакцію, оскільки існує комплементарність ГП та ГТ у метаболізмі ендогенних пероксидів [14]. Зниження активності таких антирадикальних та антипероксидних ферментів, як Mn-SOD і ГП, а також накопичення токсичного GSSG, який здатен утворювати змішані дисульфідні з тіолвмісними ферментами, тим самим порушуючи їхню активність [10, 14], свідчать про наявність дисбалансу в проантиоксидантній системі мітохондрій тварин, що були піддані гострій іммобілізації.

Після іммобілізаційного стресу у тварин, яких тренували за умов переривчастої гіпоксії, зростання активності Mn-SOD, ГП, підвищення вмісту GSH можуть бути причиною значного зниження кількості  $O_2^-$  та вторинних продуктів ПОЛ у порівнянні з тваринами II групи. При цьому кількість  $H_2O_2$ , як і GSSG, хоча і знижувалася відносно стресованих тварин, але залишалася вищою за контроль (див. табл. 1, 2, 3). На сьогодні доведено, що цілком певні молекулярні структури, а саме сульфгідрильні групи, які належать бічним ланцюгам залишків цистеїну, є мішенями  $H_2O_2$  і відіграють роль сенсора концентрації пероксиду водню в клітинних структурах [11]. Збереження активності ГР на рівні контролю обумовлено, імовірно, підвищенням активності ІЦДГ на 15% ( $p < 0,05$ ), а отже, і достатньою кількістю внутрішньоклітинних запасів НАДФН. Ці дані, а також позитивна кореляція активності ГР та НАДФ-ІЦДГ ( $r = 0,86$ ) дозволяють стверджувати, що синтез НАДФН у НАДФ-ІЦДГ реакціях під час дії екстремальних факторів може бути одним з істотних джерел відновлених еквівалентів у мітохондріях печінки щурів.

Одержані результати свідчать про те, що глутатіонова редокс-система, глутатіонзалежна, а також НАДФН-генеруючі ферменти мітохондрій печінки щурів безпосередньо беруть участь у формуванні власних захисних механізмів за умов тривалої дії переривчастої гіпоксії. Висока спряженість окисно-відновних процесів системи глутатіону вказує на специфічний характер змін вмісту тіолових сполук у мітохондріях при дії на організм екстремальних факторів, а також на участь їх у формуванні та регуляції перехресних ефектів адаптації.

1. Колчинская А. З., Цыганова Т. Н., Остапенко Л. А. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. – Москва: Наука, 2003. – 408 с.
2. Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В. Роль свободнорадикальных процессов в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Под ред. Л. Д. Лукьяновой, И. Б. Ушакова. – Москва: Наука, 2004. – С. 112–137.
3. Лукьянова Л. Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптация организма // Физиол. журн. – 2003. – **49**, № 3. – С. 17–35.
4. Wenger R. H. Cellular adaptation to hypoxia:  $O_2$ -sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and  $O_2$ -regulated gene expression // FASEB J. – 2002. – **16**. – P. 1151–1162.
5. Saez G. T., Bannister W. H., Bannister J. V. Glutathione: Metabolism and Physiological Functions / Ed. J. Vina. – Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1990. – P. 237–254.
6. Dickinson D. A., Forman H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism // Biochem. Pharmacol. – 2002. – **4**. – P. 1019–1026.
7. Путьлилина Ф. Е. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.

8. Anderson M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples // *Methods Enzymol.* – 1985. – **113**. – P. 548–551.
9. Осипов А. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. Активные формы кислорода и их роль в организме // *Успехи биол. химии.* – 1990. – **31**. – С. 180–208.
10. Sies H., Moss K. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver // *Eur. J. Biochem.* – 1978. – **8**. – P. 377–383.
11. Быстрова М. Ф., Буданова Е. Н. Перекись водорода и пероксиредоксины в редокс-регуляции внутриклеточной сигнализации // *Биол. мембраны.* – 2007. – **24**, № 2. – С. 115–125.
12. Lee S. M., Koh H. J., Park D. C. et al. Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – **32**. – P. 1185–1196.
13. Jo S., Son M., Koh H. et al. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 16168–16176.
14. Hayes J., McLellan L. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defense against oxidative stress // *Free Rad. Res.* – 1999. – **31**. – P. 273–300.

*Институт фізіології ім. О. О. Богомольця  
НАН України, Київ*

*Надійшло до редакції 28.10.2008*

**O. A. Gonchar**

### **Participation of the mitochondrial glutathione redox-system in formation of the adaptive response during hypoxia/reoxygenation**

*Repetitive periods of hypoxia/reoxygenation (H/R) [5 cycles of 5 min hypoxia (12% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>) followed by 15 min normoxia, daily for three weeks] attenuated O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production as well as lipid peroxidation in liver mitochondria of rats exposed to acute immobilization. Adaptation to moderate H/R enhances the production and activity of reactive oxygen species scavengers such as glutathione, manganese superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase in mitochondria. It is demonstrated that the maintenance of the GSH-redox cycle by activation of glutathione reductase and NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase is an integral part of the biochemical adaptive mechanism of oxidative tolerance to a new damaging factor.*