

Енергетичний та антиоксидантний статус мітохондрій печінки щурів за умов гіпоксії-реоксигенації різної тривалості

О.О.Гончар¹, В.І.Носар¹, Л.В.Братусь¹, І.М.Тимченко², М.М.Стешенко¹, І.М.Маньковська¹

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, ²ПВНЗ «Київський медичний університет УАНМ»; e-mail: ogonchar@yandex.ru

Досліджували зміни функціональної активності та експресії білка антирадикальних Мп-супероксиддисмутази (Мп-СОД), глутатіонзалежних (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази) та НАДФН-генеруючих (НАДФ-ізоцитратдегідрогенази) ферментів, а також показників енергетичного метаболізму мітохондрій печінки щурів, яких піддавали впливу жорсткої (5% O₂) гіпоксії в сеансах гіпоксії – реоксигенації різної тривалості (1, 3, 7, 14 діб). Пролонгована гіпоксія-реоксигенація характеризувалася фазовими коливаннями концентрації кортикостерону в крові щурів, які відповідали змінам в енергетичному обміні, а також у про- та антиоксидантному балансі мітохондрій. Було показано, що короткотермінова гіпоксія-реоксигенація з використанням 5% O₂ у газовій суміші (1 доба) викликала зростання концентрації кортикостерону, а також значну активацію прооксидантних процесів та енергетичного обміну, інтенсивність яких знижувалася на 3-тю добу. Довготривала гіпоксія-реоксигенація (7–14-та доба) призводила до поступового виснаження адаптаційних можливостей організму, про що свідчить різке зниження концентрації кортикостерону в крові щурів, зростання вмісту вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів, дисбаланс у про- та антиоксидантних реакціях, зниження енергетичних можливостей мітохондрій клітин печінки. Динаміка активності та експресії білка глутатіонпероксидази позитивно корелювала зі вмістом H₂O₂ та негативно – з кількістю білка Мп-СОД впродовж 1–7-ї доби експерименту, і лише на 14-ту добу щоденних сеансів гіпоксії-реоксигенації функціональна активність та експресія білка Мп-СОД наблизилися до контрольних значень. Зростання активності НАДФ-ізоцитратдегідрогенази, глутатіонпероксидази, та глутатіонредуктази за умов довготривалої дії гіпоксії-реоксигенації свідчить про активне включення глутатіонових, а також НАДФН-генеруючих ферментів у процеси антиоксидантного захисту.

Ключові слова: гіпоксія-реоксигенація; мітохондрій; антиоксидантні ферменти; експресія білка.

ВСТУП

У наш час збільшується розповсюдженість і вірогідність розвитку патологічних станів, пов'язаних з гіпоксією та реоксигенацією. Відомо, що реакція організму на такий екзогенний вплив, поряд з низкою різних регуляторних процесів, забезпечується також і стрес-реалізуючими симпато-адреномедулярною та гіпоталамо-гіпофізо-кортикоадреналовою системами. Важливою пристосувальною реакцією за цих умов є фазова активація стрес-

гормонів: глюкокортикоїдів, катехоламінів, та кортикотропіну [1, 2]. Повідомляється, що глюкокортикоїди стабілізують клітинні мембрани, активують деякі ферменти дихального ланцюга, сприяють низці інших метаболічних ефектів пристосувального характеру, що впливають на стійкість клітин до нестачі кисню [3].

Мітохондріям належить центральне місце у клітинній адаптації до зміни вмісту кисню завдяки залученню їх у метаболічні,

© О.О.Гончар, В.І.Носар, Л.В.Братусь, І.М.Тимченко, М.М.Стешенко, І.М.Маньковська

енергетичні та вільнорадикальні процеси [4]. За умов окисного стресу, що супроводжує гіпоксію-реоксигенацію, дослідження функціонування мітохондрій набуває особливого значення, оскільки вони відіграють ключову роль в енергозабезпеченні організму, і є одним із джерел активних кисневих метаболітів, які з одного боку можуть виступати деструктивним фактором, а з іншого – центральним регуляторним та виконавчим ланцюгом сигнальних клітинних каскадів [1, 4]. У цьому аспекті важливим є дослідження стану антиоксидантної системи мітохондрій, від активності та експресії білка різних компонентів якої залежать не тільки ефективність захисних процесів, але й стан редоксчутливих регуляторних факторів, що ініціюють різноманітні сигнальні шляхи [5]. Ланка антиоксидантних реакцій у механізмах захисних процесів є провідною і найбільш потужною, оскільки вона не тільки запобігає розвитку вільнорадикальних реакцій, накопиченню супероксид-аніонів, органічних і неорганічних перекисів, але й підтримує високу активність окисно-відновних процесів, забезпечує елімінацію кисневих метаболітів із залученням їх в енергетичний обмін, сприяє активності синтетичних процесів [6]. Відомо, що функціонування як неферментної, так і ферментної ланок антиоксидантного захисту залежить від фонду донорів водню [6, 7]. Внутрішньоклітинні запаси НАДФН забезпечують підтримку глутатіону у відновленому стані і тим самим впливають на стан глутатіонового редокс-циклу [8]. Припускають, що у мітохондріях з усіх ферментів – донорів НАДФН ізоцитратдегідрогенази (ІЦДГ) належить вагомий роль. У працях останніх років показано значне зростання продукції активних форм кисню (АФК), фрагментація ДНК, інтенсифікація процесів ПОЛ, зменшення вмісту АТФ у мітохондріях при зниженні експресії ІЦДГ [9]. Однак функція мітохондріальної ІЦДГ, яка каталізує декарбоксілювання ізоцитрату в α -кетоглутарат із конкурентною продукцією НАДФН [7, 9],

за умов переривчастої гіпоксії залишається невизнаною.

Відомо, що помірної (10 – 12% O_2) гіпоксія може ефективно стимулювати різні метаболічні процеси і цей феномен широко застосовується в медичній і спортивній практиці [10 – 12]. У літературі дискутуються питання щодо інтенсивності та тривалості циклів гіпоксія-реоксигенація у процесі інтервальних гіпоксичних тренувань, однак однозначного погляду на цю проблему немає [5, 10]. Яким буде вплив жорсткої (5% O_2) гіпоксії в сеансах гіпоксії-реоксигенації різної тривалості на про- та антиоксидантний гомеостаз і енергозабезпечення мітохондрій, ще остаточно не з'ясовано.

Мета нашого дослідження – вивчення динаміки функціональної активності та експресії білка антирадикальних (Mn-SOD), глутатіонзалежних (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази), та НАДФН – генеруючих (НАДФ-ізоцитратдегідрогенази) ферментів, а також енергетичного метаболізму мітохондрій печінки щурів, яких піддавали впливу жорсткої гіпоксії-реоксигенації, за умов фазових змін у крові вмісту кортикостерону.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 230-250г, які знаходилися на стандартному раціоні. Тварин, яких розподілили на групи по 8 у кожній, піддавали щодня дії жорсткої гіпоксії (дихання гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 5% O_2 в N_2 протягом 30 хв) з наступною 24-годинною реоксигенацією (21% O_2). Контрольну групу склали тварини, яких утримували за нормоксичних умов – 1-ша група. Дослідження проводили після першої доби експерименту – 2-га група; після 3-ї доби – 3-тя група; після 7-ї доби – 4-та група; після 14-ї доби – 5-та група. Сеанси гіпоксії-реоксигенації відбувалися у герметичних нормобаричних камерах, де підтримувалася постійна кімнатна температура. Для погли-

нання виділеного вуглекислого газу і водяних парів у камерах використовували адсорбент. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом відразу після експерименту. Тварин утримували та маніпуляції з ними здійснювали відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Печінку, видалену з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином NaCl. Усі маніпуляції проводили при 0-4°C. Мітохондрії з гомогенатів печінки отримували методом диференційного центрифугування. Середовище виділення мітохондрій містило (ммоль/л) сахарози—250, Тріс HCl—10, EGTA—1 та 0,5 % БСА (рН 7,6). Відмивали та ресуспендували мітохондрії у середовищі, яке не мало у своєму складі EGTA та БСА. Процеси АДФ-стимульованого дихання та окисного фосфорилування мітохондрій печінки вивчали полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка та оксиграфа (Oxygraph System «Hansatech», Англія). Функціональний стан мітохондрій досліджували методом Chance та Williams [13]. Середовище інкубації складалося з (ммоль/л): KCl—120, KH_2PO_4 —2, NEPES—10 (рН 7,2). Субстратами окиснення були (ммоль/л): сукцинат натрію—5; глутамат натрію—5; малат—2,5. У середовище додавали 200 мкмоль/л АДФ. Інгібітором мітохондріального ферментного комплексу I був ротенон (2 мкмоль/л). За отриманими полярограмами розраховували такі показники: швидкість фосфорилуючого (в метаболічному стані 3 за Чансом, V_3) та контрольованого (в метаболічному стані 4 за Чансом, V_4) дихання мітохондрій, дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4) [13], коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О [14]. Концентрацію білка вимірювали за методом Лоурі.

Для біохімічних досліджень мітохондріальні протеїни солюбілізували додаванням 0,1%-го розчину Тритон X-100. У суспензії мітохондрій вивчали вміст активних продук-

тів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [15] та H_2O_2 [16]. Активність Mn—супероксиддисмутази (Mn-SOD) визначали за методом [17], що ґрунтується на її здатності гальмувати аутоокиснення адреналіну. Активність мітохондріальної глутатіонредуктази оцінювали спектрофотометрично за зменшенням вмісту НАДФН за 1 хв на 1 мг протеїну за довжини хвилі 340 нм [18]. Активність селензалежної глутатіонпероксидази визначали реєстрацією швидкості окиснення НАДФН за наявності відновленого глутатіону, пероксиду водню та глутатіонредуктази (2,4 U/мл) [19]. Активність НАДФ-ізоцитратдегідрогенази (НАДФ-ІЦДГ) досліджували за швидкістю відновлення НАДФН у середовищі, що містило (ммоль/л): Тріс-HCl—50, ізоцитрату—1,5, НАДФН—0,25 (рН 7,8) [18].

Рівень експресії білка антиоксидантних ферментів у мітохондріальній фракції печінки визначали за допомогою імуноблотингу. Білки розділяли у 12%-му поліакриламідному гелі на обладнанні BioRad і переносили на PVDF- мембрану за допомогою електроелектролізу. Застосовували первинні моноклональні антитіла до Mn-SOD (1:1000, «Sigma» США), глутатіонпероксидази (1:500, «Santa Cruz Biotechnology» США), β -актину (1:1000, «Santa Cruz Biotechnology» США) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрину (1:2000 «Sigma» США). Кількісний розрахунок отриманих імуноблотів проводили за допомогою їх сканування та обробки комп'ютерною програмою GelPro. Вміст білка визначали за методом Бредфорд. Концентрацію кортикостерону у крові щурів вимірювали за допомогою флуориметричного методу [20]. Результати досліджень обробляли статистично за допомогою програми «Origin 7.0». Вірогідність розходжень між групами порівняння була визначена методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test). Для встановлення ступеня зв'язку між вивченими показниками був проведений кореляційний аналіз із визначенням коефіцієнта кореляції Спірмана (r).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з результатами досліджень, жорстка гіпоксія – реоксигенація викликала зміни концентрації кортикостерону в плазмі крові, вираженість та спрямованість яких залежала від тривалості впливу (рис.1). Так, за 1-шу добу значення цього показника збільшувалося на 24% порівняно з контрольною групою ($P<0,05$), за 3-тю добу воно продовжувало зростати та було на 36% вищим за контроль ($P<0,05$). Проте при збільшенні тривалості впливу гіпоксії-реоксигенації до 7 діб, концентрація кортикостерону мала тенденцію до зниження, а на 14-ту добу була на 26% нижчою за контроль ($P<0,05$), що може бути викликано виснаженням стрес-лімітуючих систем організму. Зростання концентрації кортикостерону протягом перших (1 – 3) діб корелює з даними інших дослідників, які показали підвищення вмісту кортикостероїдних гормонів та кортиколиберину у відповідь на дію пролонгованої інтервальної гіпоксії, а також гострої гіпоксії [21, 22]. Відомо, що остання активує секрецію адренокортикотропного гормону через цАМФ-залежні механізми, які регулюються кортиколиберином, вазопресинном та норепінефрином [23], і ступінь такої активації знижується при збільшенні тривалості гіпоксичного впливу [21, 23]. Отже, отримані нами результати

вказують на фазовий характер змін концентрації стрес-гормону в крові щурів за умов гіпоксії-реоксигенації.

Визначені нами показники окисного фосфорилування в мітохондріях печінки щурів за 1-шу добу після дії гіпоксії – реоксигенації свідчать, що в разі окиснення сукцинату вірогідних змін у роботі дихального ланцюга та синтезу АТФ не було зареєстровано (табл.1). За умов окиснення НАД-залежних субстратів відбувалася низка змін інтенсивності киснезалежних процесів у мітохондріях печінки, а саме: підвищувалася швидкість субстратного дихання мітохондрій (V_4^s), знижувалися дихальний контроль та енергетична ефективність синтезу АТФ (АДФ/О) (табл.2). Отже за умов дії жорсткої гіпоксії-реоксигенації збільшується внесок сукцинатаоксидазного шляху порівняно з НАДН-оксидазним у потік електронів дихального ланцюга, оскільки він менш чутливий до дефіциту кисню. Крім того, за умов дії гострої гіпоксії, сукцинат накопичується у тканинах, що робить його доступнішим до окиснення [24].

Після 3-ї доби гіпоксії – реоксигенації за умов окиснення сукцинату зростала швидкість субстратного дихання відносно контролю, решта показників залишалася на рівні контрольних значень. Зміни в енергетичному метаболізмі мітохондрій за умов

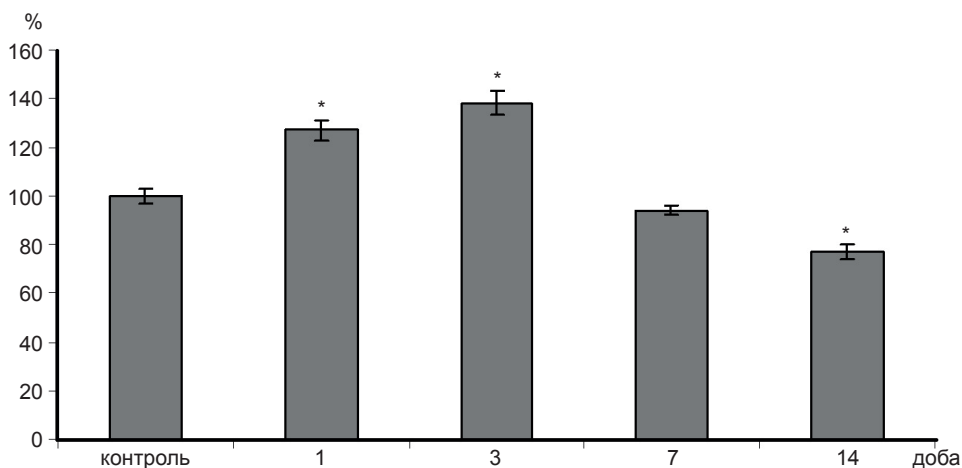


Рис. 1 Вплив жорсткої гіпоксії – реоксигенації на концентрацію кортикостерону у крові щурів. Показники у тварин контрольної групи прийняті за 100%. * $P<0,05$ відносно контролю

Таблиця 1. Вплив жорсткої гіпоксії – реоксигенації на показники окисного фосфорилування мітохондрій печінки щурів при застосуванні 5 ммоль/л сукцинату як субстрату окиснення і 2 мкмоль/л ротенону (нг атом О· хв⁻¹·мг⁻¹білка; M±m; n =8)

Умови досліджу	V ₄ ^s	V ₃	V ₄ ^{АТФ}	V ₃ /V ₄ ^{АТФ}	АДФ/О
Контроль	25,00±1,25	56,71±5,89	24,4±2,0	2,32±0,08	1,60±0,08
Через					
1 добу	22,21±4,12	58,30±7,76	23,70±3,15	2,46±0,11	1,48±0,14
3 доби	37,70±4,16*	49,11±5,07	21,92±2,96	2,24±0,10	1,46±0,07
7 діб	24,82±1,60	64,73±4,61	26,53±1,21	2,44±0,09	1,49±0,05
14 діб	30,51±2,91*	67,60±4,24*	31,32±0,90*	2,16±0,08	1,44±0,08

Примітка. Тут і в табл.2 * P<0,05 відносно контролю

окиснення глутамату і малату виявлялися лише в зменшенні спряження дихання з фосфорилуванням.

На 7-му добу гіпоксії–реоксигенації істотні біоенергетичні зміни відбувалися, головним чином, при окисненні НАД-залежних субстратів: зростало субстратне дихання, зменшувалося дихання в активному стані органел, його спряження з фосфорилуванням та ефективність використання кисню (див. табл.1). Отже, наведені результати вказують на суттєве зниження енергетичного обміну мітохондрій печінки за умов окиснення НАД-залежних субстратів внаслідок впливу на щурів гіпоксії–реоксигенації протягом 7 сеансів.

Після 14-го сеансу гіпоксії–реоксигенації окиснення ФАД-залежних субстратів характеризується зростанням параметрів дихання в станах V₄^s, V₃, V₄^{АТФ} на тлі тенденції до зниження спряження дихання з фосфорилуванням та АДФ/О. За умов окиснення НАД-залежних субстратів зростала швидкість субстратного та контрольованого дихання

при зниженні дихального контролю та коефіцієнта АДФ/О. Отже, за умов окиснення сукцинату відбувалося м'яке роз'єднання дихального ланцюга мітохондрій печінки, яке супроводжувалося лише незначними змінами енергетичного обміну. Отримані нами результати узгоджуються з твердженням [24], що за умов стресу різного генезу (гіпоксії, гіпокінезії тощо) найбільших змін зазнає мітохондріальний ферментний дихальний комплекс I, оскільки саме при використанні НАД-залежних субстратів суттєво знижується енергозабезпечення організму при гіпоксії.

Вважається, що циклічні переходи гіпоксія – нормоксія реалізують свій вплив на енергетичний метаболізм, в основному, через активацію вільнорадикальних процесів, які ініціюються надлишком донорів електронів відновлених еквівалентів, що накопичуються при гіпоксії та, в результаті зростання O₂ як акцептора електронів, при реоксигенації [1]. Як показали наші дослідження, застосування прийнятої схеми гіпоксії–реоксигенації

Таблиця 2. Вплив жорсткої гіпоксії– реоксигенації на показники окисного фосфорилування мітохондрій печінки щурів при використуванні 5 ммоль/л глутамату і 2,5 ммоль/л малату як субстратів окиснення (нг атом О· хв⁻¹·мг⁻¹білка; M±m; n =8)

Умови досліджу	V ₄ ^s	V ₃	V ₄ ^{АТФ}	V ₃ /V ₄ ^{АТФ}	АДФ/О
Контроль	22,00±2,06	50,31±4,11	19,41±2,39	2,60±0,06	2,45±0,07
Через					
1 добу	31,91±2,87*	44,52±3,18	19,4±0,70	2,49±0,05 [#]	2,31±0,06*
3 доби	23,21±2,66	44,83±4,52	19,55±1,06	2,30±0,06*	2,37±0,05
7 діб	28,00±1,21*	43,00±2,74*	18,21±1,57	2,36±0,10*	2,29±0,06*
14 діб	36,50±5,82*	55,11±4,02	24,31±2,47*	2,27±0,07*	2,17±0,04*

призводило до значних змін у про – та антиоксидантній системі мітохондрій печінки щурів протягом усього періоду досліджень. Так, короткотривала гіпоксія–реоксигенація (1-ша доба) викликала зростання вмісту ТБК-АП на 41% ($P<0,05$) зі зниженням до контрольних значень на 3-тю добу. На 7-му та 14-ту добу експерименту вміст вторинних продуктів ПОЛ продовжував зростати на 43 і 58 % відповідно ($P<0,05$; рис. 2). Деякі автори відмічали, що підвищення ступеня гіпоксії та тривалості періоду реоксигенації призводить до збільшення продукції АФК та появи побічних негативних ефектів. Так, тренування в умовах гіпобаричної гіпоксії (підвищення „висоти” з 5 000 до 6 500м, а також збільшення тривалості кожного циклу в умовах барокамери) викликало порушення мембранних структур серця і, особливо, печінки [5, 12], зниження вмісту глутатіону та активності СОД у мозку щурів [25], що спричинювало зрив адаптації.

Короткотривала гіпоксія–реоксигенація викликала зростання активності Mn-SOD відносно контролю на 56% ($P<0,05$; рис. 3, а), що можна пояснити компенсаторним

підвищенням активності цього ферменту у відповідь на збільшення продукції супероксид-радикала, який, як відомо, виступає субстратом для Mn-SOD [6]. Інші дослідники також відзначають підвищення активності Mn-SOD за умов гострої гіпоксії, що корелює із зростанням рівня ПОЛ [7, 25, 26]. Відомо, що більша частка супероксидного радикала, який генерується мітохондріями за умов гіпоксії–реоксигенації, вивільняється в мітохондріальний матрикс, де перетворюється на пероксид водню за участю міжмембранної Mn-SOD [1, 4]. Висока активність Mn-SOD, що рееструвалася в мітохондріях за 1-шу добу експерименту, свідчить про швидкий рівень дисмутації O_2^- і відповідає зростанню кількості H_2O_2 (на 48%) порівняно з контролем ($P<0,05$; див. рис. 2). При цьому кількість білка Mn-SOD була нижчою від контрольних значень, що можна пояснити, на нашу думку, напевне зниженням експресії мРНК цього ферменту (див. рис. 3а). У нормі клітини запобігають токсичних ефектів перекисних сполук завдяки антиоксидантним системам, які відповідальні за розпад H_2O_2 . До цих систем відносяться ферменти

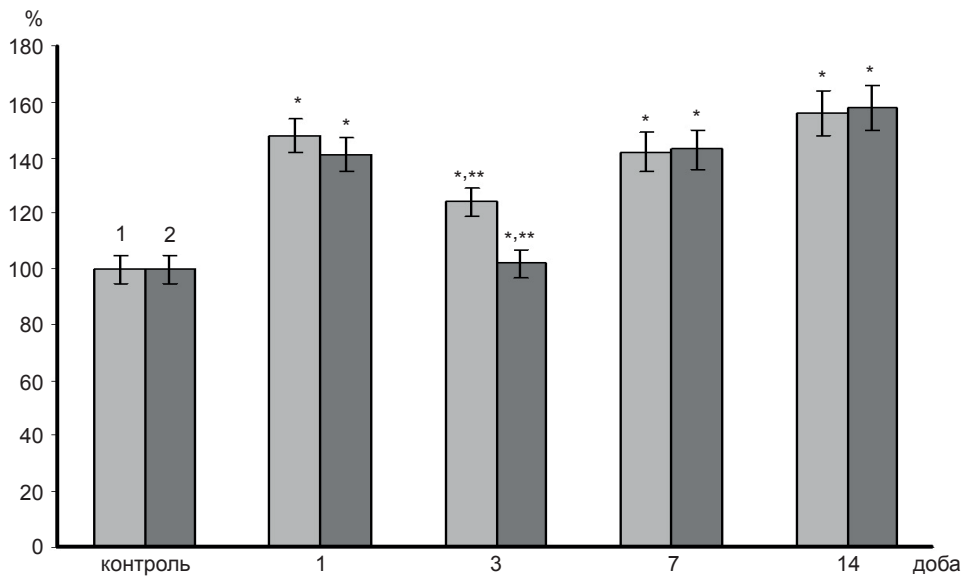


Рис. 2 Вплив жорсткої гіпоксії–реоксигенації на вміст активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (1) та H_2O_2 (2). Показники у тварин контрольної групи прийняті за 100%.

* $P<0,05$ відносно контролю; ** $P<0,05$ відносно показників 1-ї доби

окисно – відновних циклів глутатіону, а саме глутатіонпероксидази і глутатіонредуктаза [6, 8], активність яких у нашому дослідженні за 1-шу добу після впливу гіпоксії–реоксигенації збільшувалася на 41 та 54 % відповідно на відміну від контрольних значень ($P<0,05$). Ріст активності цих ферментів, можливо, був зумовлений достатньою кількістю внутрішньоклітинних запасів НАДФН, про що свідчить різке зростання активності НАДФН-генеруючого ферменту ЩДГ на 43% ($P<0,05$; див. рис. 3, б). За 3-тю добу щоденних сеансів гіпоксії–реоксигенації в мітохондріях печінки щурів концентрація ТБК-АП, H_2O_2 , так само, як і активність Mn-SOD і глутатіон-залежних ензимів знижувалися відносно значень цих показників на 1-шу добу гіпоксії–реоксигенації ($P<0,05$; див. рис. 2, 3).

Довготривала гіпоксія–реоксигенація призводила до зростання вмісту H_2O_2 (на 42

та 57%), а також активності глутатіонпероксидази (на 17 та 43%) відповідно порівняно з контролем ($P<0,05$). 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 та ін. [27]. Однак на відміну від деяких інших внутрішньоклітинних медіаторів, наприклад кальцію, H_2O_2 легко проникає крізь мембранні структури і тому не може накопичуватися. Отже сигнали, які H_2O_2 здатний переносити, можуть контролюватися на рівні синтезу – розпаду останнього, що говорить про вагомую роль у цих процесах ферментів окисно–відновного циклу глутатіону [8, 28]. Динаміка вмісту H_2O_2 в мітохондріях печінки щурів корелювала з активністю глутатіонпероксидази ($r= 0,85$) впродовж усього терміну експерименту. Ці результати узгоджуються зі

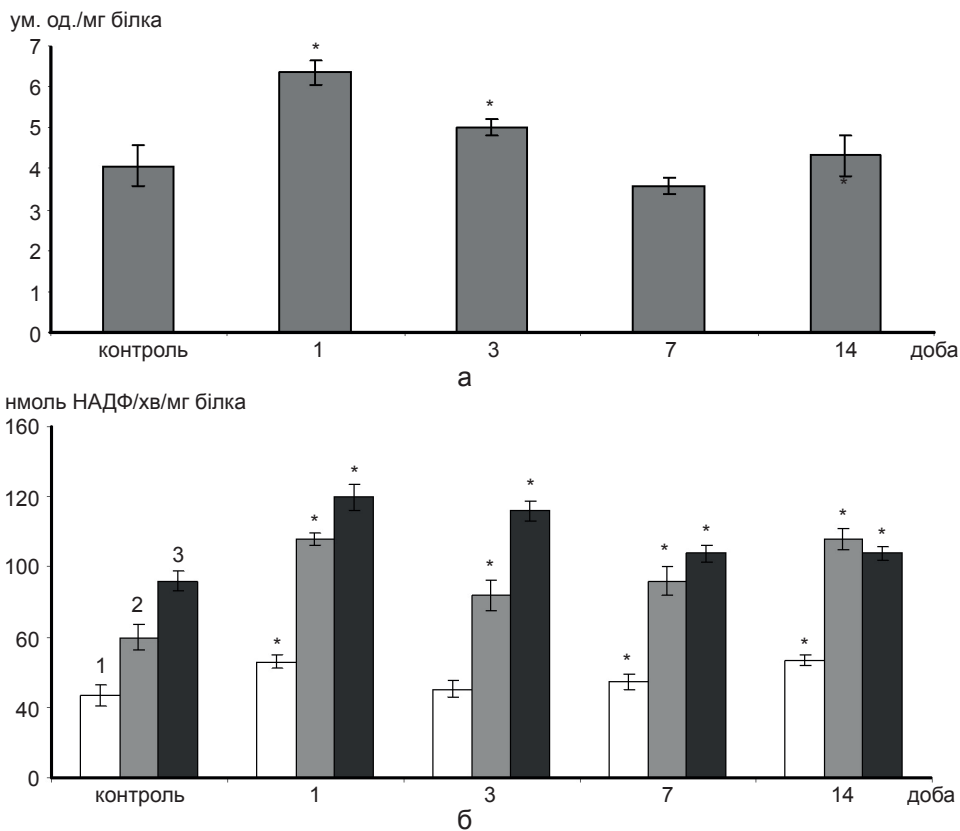


Рис. 3 Вплив жорсткої гіпоксії–реоксигенації на активність ферментів: а- Mn- супероксиддисмутази; б- глутатіонпероксидази (1), глутатіонредуктази (2), та НАДФ-ізоцитратдегідрогенази (3) в мітохондріях печінки щурів. * $P<0,05$ відносно контролю

значеннями експресії білка глутатіонпероксидази (рис. 4). Так, рівень експресії білка глутатіонпероксидази в мітохондріях печінки щурів з 1-ї по 14-ту добу експерименту був вище від контрольних значень (на 14-ту добу до 70%, $P < 0,05$), що свідчить про активізацію синтезу цього ферменту. Можна вважати, що індукція глутатіонпероксидази за таких умов є захисною реакцією на надмірне утворення кисневих метаболітів, які можуть активувати через різні сигнальні шляхи (Nrf2, NF- κ B, AP-1 тощо) експресію антиоксидантних ферментів, зокрема глутатіонпероксидазу [29]. Позитивна кореляція між рівнем експресії білка та активністю глутатіонпероксидази ($r=0,78$), активністю глутатіонпероксидази та вмістом H_2O_2 ($r=0,86$) за умов довготривалої дії гіпоксії-реоксигенації засвідчує активне включення антиперекисних ферментів у процеси захисту клітин від окисного стресу. Збереження активності глутатіонредуктази за 14-ту добу гіпоксії-реоксигенації, зумовлено, ймовірно, підвищенням активності ІЦДГ на 14% ($P < 0,05$), а таким чином, і достатньою кількістю внутрішньоклітинних запасів

НАДФН. Ці результати, а також позитивна кореляція активності глутатіонредуктази та НАДФ-ІЦДГ ($r=0,76$) дають змогу стверджувати, що синтез НАДФН у НАДФ-ІЦДГ реакціях під час дії екстремальних факторів може бути одним із істотних джерел відновлених еквівалентів у мітохондріях печінки щурів.

За тривалої гіпоксії-реоксигенації активність Mn-SOD була у межах контролю (див. рис. 3 а). Дослідження кількості білка Mn-SOD у мітохондріях печінки щурів імуноблотингом показало, що на 1, 3 та 7-му добу експерименту вона була нижче від контрольних значень і лише через 14 діб гіпоксії-реоксигенації наближалася до контролю (див. рис. 4). Відомо, що додатковим важливим фактором, який впливає на редокс-середовище матриксу мітохондрій, є баланс між активністю пероксидаз і Mn-SOD [26, 28, 30]. У цьому дослідженні жорстка гіпоксія за різної тривалості в сеансах гіпоксії-реоксигенації призводила до зростання активності та кількості білка глутатіонпероксидази та, навпаки, до зниження синтезу протеїну Mn-SOD. Така

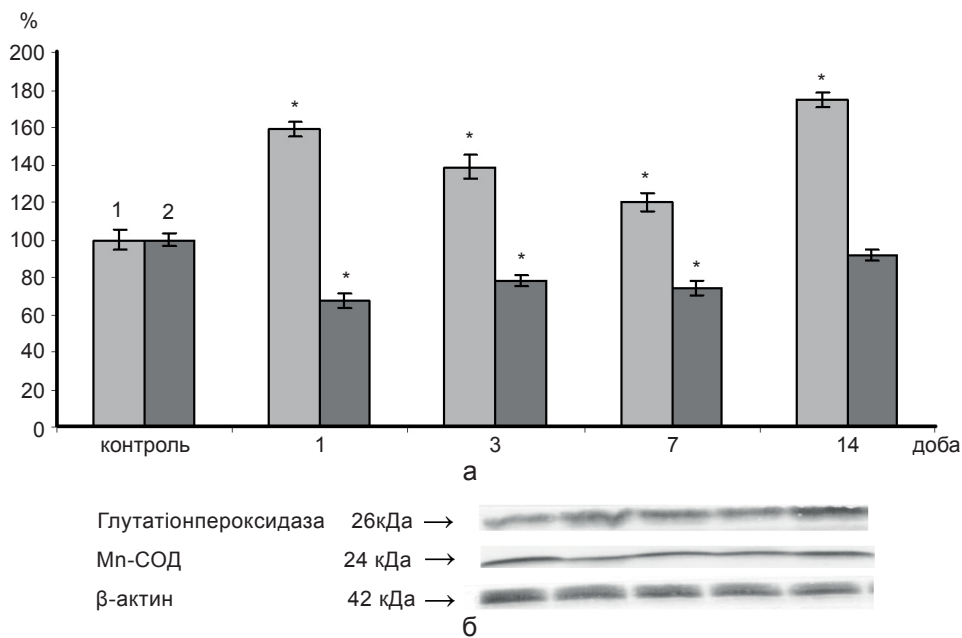


Рис.4. Відносні показники експресії протеїну глутатіонпероксидази (1) та Mn-супероксиддисмутази (2 – MnCOД) у мітохондріях печінки тварин, що піддавалися впливу жорсткої гіпоксії-реоксигенації (рівень експресії протеїну у тварин контрольної групи прийнятий за 100%; $n = 8$). * $P < 0,05$ відносно контролю

динаміка антиоксидантних реакцій на фоні збереження підвищеного вмісту ТБК-АП та H_2O_2 впродовж 1 та 7 – 14-ї доби щоденних сеансів жорсткої гіпоксії – реоксигенації свідчить про неповну збалансованість про – та антиоксидантних процесів у мітохондріях печінки шурів.

Отже, наші дослідження показали, що в процесі жорсткої гіпоксії– реоксигенації можна виділити декілька фаз зміни концентрації кортикостерону в крові шурів. Перша фаза відповідає періоду термінової адаптації, яка характеризується підвищенням вмісту в крові стрес-гормону. Відомо, що у цей період мобілізуються киснетранспортні системи (гіпервентиляція легень, зростання хвилинного об'єму серця, підвищення артеріального тиску), котрі направлені на збереження достатньої ефективності біологічного окиснення у тканинах. Розвивається стресорна реакція з активацією симпатико – адреналової системи і системи АКТГ, мобілізацією енергетичних і пластичних ресурсів на межі фізіологічних можливостей, що не повною мірою забезпечує адаптаційний ефект [2, 3]. Друга фаза відповідає перехідній стадії. В мітохондріях печінки нормалізується про – антиоксидантний баланс: вміст вторинних продуктів ПОЛ і перекису водню, активність глутатіонпероксидази знижуються до контрольних значень, відновлюється енергозабезпечення клітин печінки. Всі ці процеси відбуваються на тлі підвищеного вмісту кортикостерону в крові шурів. Якщо дія агента, котрий викликав реакції адаптації до гіпоксії, продовжується тривалий час, відбувається поступовий перехід від строкової до довготривалої адаптації, протягом якого організм починає набувати підвищену стійкість до гіпоксії. Однак це відбувається за умов дії подразнюючого фактора помірної сили [2, 3]. У нашому випадку тривала жорстка гіпоксії–реоксигенації призводила до поступового виснаження адаптаційних можливостей організму, про що свідчить різке зниження концентрації кортикосте-

рону в крові шурів, зростання переокисних та окисних процесів, дисбаланс у про- та антиоксидантних реакціях, зниження енергетичних можливостей клітин печінки.

ВИСНОВКИ

1. Вплив жорсткої гіпоксії–реоксигенації характеризується фазовими змінами концентрації кортикостерону у крові шурів, що відповідає змінам у енергетичному обміні, а також у про- та антиоксидантному балансі у мітохондріях печінки шурів.

2. Короткотермінова гіпоксія–реоксигенація з використанням 5% O_2 у газовій суміші (1 доба) призводила до значної активації прооксидантних процесів та енергетичного обміну за рахунок сукцинатоксидазного шляху у мітохондріях печінки шурів, інтенсивність яких знижувалася на 3-тю добу. Довготривала гіпоксія–реоксигенація (7 – 14-та доба) викликала подальше зростання вмісту вторинних продуктів ПОЛ і зниження енергозабезпечення, що свідчить про підвищення в мітохондріях печінки шурів рівня оксидативних процесів.

3. Зростання активності НАДФ–ІЦДГ, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, а також експресії білка глутатіонпероксидази за умов довготривалої дії гіпоксії–реоксигенації зумовлює активне залучення глутатіонових, а також НАДФН-генеруючих ферментів у процеси захисту від окисного стресу.

4. Зниження експресії білка Mn-SOD на фоні підвищеного вмісту ТБК-АП та H_2O_2 підтверджує наявність неповної збалансованості про- та антиоксидантних процесів у мітохондріях печінки шурів впродовж короткочасних і тривалих сеансів гіпоксії–реоксигенації.

**О.А.Гончар, В.И.Носар, Л.В.Братусь,
И.Н.Тимченко, Н.Н.Стешенко, И.Н.Маньковская**
**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ И АНТИОКСИДАНТ-
НЫЙ СТАТУС МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ
КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ–РЕОКСИГЕНАЦИИ
РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ**

Исследовали динамику функциональной активности и экс-

прессии белка антирадикальных Mn-супероксиддисмутаза (Mn-СОД), глутатион-зависимых (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза), НАДФН-генерирующих (НАДФ-изоцитратдегидрогеназа) ферментов, а также энергетического метаболизма (митохондриальное дыхание по Чансу) митохондрий печени крыс, которых подвергали жесткой гипоксии (5% O₂) в сеансах гипоксии-реоксигенации различной продолжительности (1, 3, 7, 14 сут). Пролонгированная гипоксия-реоксигенация характеризовалась фазовыми изменениями концентрации кортикостерона в крови крыс, что соответствовало изменениям в энергетическом обмене, а также в про-и антиоксидантном балансе в митохондриях печени крыс. Было показано, что кратковременная гипоксия-реоксигенация (1-е сутки) приводила к росту концентрации кортикостерона, а также к значительной активации прооксидантных процессов и энергетического обмена за счет сукцинатоксидазного пути окисления в митохондриях печени крыс, интенсивность которых снижалась на 3-и сутки. Продолжительная гипоксия-реоксигенация (7-14-е сутки) приводила к постепенному истощению адаптационных возможностей организма, о чем свидетельствует резкое снижение концентрации кортикостерона в крови крыс, увеличение содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов, дисбаланс в про-и антиоксидантных реакциях, снижение энергетических возможностей клеток печени. В течение 1-7-х суток эксперимента экспрессия белка глутатионпероксидазы положительно коррелировала с содержанием H₂O₂ и негативно с количеством белка Mn-СОД, и только на 14-е сутки ежедневных сеансов гипоксии-реоксигенации функциональная активность и экспрессия белка Mn-СОД приближались к контрольным значениям. Рост активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и НАДФН-изоцитратдегидрогеназы при продолжительной гипоксии-реоксигенации свидетельствует об активном включении глутатионовых, а также НАДФ-генерирующих ферментов в процессы антиоксидантной защиты. Ключевые слова: гипоксия-реоксигенация; митохондрии; антиоксидантные ферменты; экспрессия белка.

**O.A.Gonchar¹, V.I.Nosar¹, L.V.Bratus¹,
I.N.Tymchenko², N.N.Steshenko¹, I.N.Mankovska¹**

ENERGETIC AND ANTIOXIDANT STATUS OF RAT LIVER MITOCHONDRIA DURING HYPOXIA-REOXYGENATION OF DIFFERENT DURATION

Dynamics of changes in activity and protein expression of antiradical (MnSOD), glutathione-dependent (glutathione peroxidase, glutathione reductase) and NADP+-generated (isocitrate dehydrogenase) enzymes as well as in the energy metabolism indices in rat liver mitochondria under hypoxia-reoxygenation of different duration (1, 3, 7 14 days) were studied. Prolonged hypoxia-reoxygenation was characterized by phase changes of the corticosterone concentration in

rat blood, which corresponded to the changes in energy metabolism as well as in pro- and antioxidant balance in rat liver mitochondria. It has been shown that short-term (1 day) hypoxia-reoxygenation (5% O₂ in the gas mixture) led to an increase in the blood corticosterone concentration and a significant activation of oxidative processes and energy metabolism in rat liver mitochondria, the intensity of which was reduced to 3rd day. Long-term hypoxia-reoxygenation (7-14 th days) led to the gradual depletion of the organism adaptive capabilities, as evidenced by a significant decline in the blood corticosterone concentration, an increase in the content of secondary products of lipid peroxidation, an imbalance in pro- and antioxidant reactions and reduction of energy capacity in liver cells mitochondria. It has been shown that the glutathione peroxidase protein expression and enzymatic activity increased constantly during the whole experimental period and correlated positively with the level of H₂O₂. The amount of Mn-SOD protein as well as its enzymatic activity was lower in the first seven days of experiment, and it was increased in consequent days up to the control level on 14th day. Increased activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase during prolonged hypoxia-reoxygenation indicates that glutathione- and NADPH-generating enzymes, were actively involved in the antioxidant protect.

Key words: hypoxia-reoxygenation; mitochondria; antioxidative enzymes; protein expression.

¹*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv;*

²*Kyiv Medical University of UAFM.*

REFERENCES

1. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol.* 2002 ;282 (Cell Physiol.): C227-C241.
2. Baraboy VA., Reznikov OG. *Physiology, biochemistry and psychology of stress.* Kyiv: Interservis; 2013. [Ukrainian].
3. Meerson FZ, Pshennikova MG. *Adaptation to the stress situations and to physical loads.* Moscow: Medicina; 1988. [Russian].
4. Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem & Cell Biol.* 2005; 37: 2478-2503.
5. Sazontova TG, Anchidhkina NA, Zhukova AG, Bedareva IV, Pylaeva EA, et al. Active oxygen forms and their redox-signaling role in adaptation to oxygen contents changing. *Fisiol J.* 2008; 2: 18-32. [Russian].
6. Meshnikova EV, Zenkov NK. Antioxidants and Inhibitors of radical oxidative processes. *Usp Sovr Biol.* 1993;113(4): 442-53. [Russian].
7. Limon-Pacheco J, Gonsebatt M. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009; 674:137-47.

8. Hayes J, McLellan L. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Rad Res.* 1999; 31: 273-300.
9. Jo S, Son M, Koh H, Lee S, Song I, et al. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 2001;276: 16168-176.
10. Clanton TL, Klawitter PF. Adaptive responses of skeletal muscle to intermittent hypoxia: the known and the unknown. *J Appl Physiol.* 2007; 90: 2476-87.
11. Gonchar O, Mankovskaya I. Effect of moderate hypoxia/reoxygenation on mitochondrial adaptation to acute severe hypoxia. *Acta Biol Hung.* 2009; 60: 185-94.
12. Lukyanova LD. Novel approach to the understanding of molecular mechanisms of adaptation to hypoxia. In: *Adaptation Biology and Medicine*, eds Hargens A, Takeda N, Singal PCurrent Concepts, New Delhi: Narosa 2005; 4:1-19.
13. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem.* 1955;217(1):383-93.
14. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP:O ration. *Methods Enzymol.* 1967;10:41-7.
15. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; LII :302-308.
16. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system. *Eur J Biochem* 1984; 141: 69-74.
17. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247: 3170-75.
18. *Methods of Biochemical investigations.* (Eds MI Prochorova). L: Izdatelstvo Leningrad universitet; 1982. [Russian].
19. Rotruck J, Pope A, Ganther H, Swanson A. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973; 179: 588-90.
20. Balashov Iu G. A fluorimetric micromethod for determining corticosteroids: a comparison with other methods. *Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova.* 1990;76(2):280-83. [Russian].
21. Zoccal DB, Bonagamba L, Antunes-Rodrigues J, Machado B H. Plasma corticosterone levels is elevated in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Autonomic Neurosci: Basic and Clin.* 2007;134(1-2): 115-17.
22. Wu Y, Du JZ. Effect of hypoxia on activity of hypothalamo-pituitary-adrenal-cortex axis in rat. *Zhongguo Ying Yong Sheng Xue Za Zhi.* 2001;17(4): 317-9.
23. Zhi C, Ji-Zen D. Hypoxia effects on hypothalamic corticotropin-releasing hormone and anterior pituitary cAMP. *Acta Pharm Sin.* 1996;17(6): 489-92.
24. Lukyanova LD. The modern problems of hypoxia. *Vestnik RAMN* 2000;9:3-12. [Russian].
25. Maiti P, Shashi B S, Alpesh K S, Muthuraju S, Pratul K B, et al. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int.* 2006; 49: 709-16.
26. Pardo M, Tirosh O. Protective signaling effect of manganese superoxide dismutase in hypoxia-reoxygenation of hepatocytes. *Free Rad Res.* 2009; 43: 1225-39.
27. Haddad J. Oxygen sensing mechanism and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res.* 2002; 3: 1-27.
28. Kinnula V, Paakko P, Soini Y. Antioxidant enzymes and redox regulation thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS Let.* 2004; 569: 1-6.
29. Sen C, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996; 10: 709-20.
30. Gonchar O, Mankovska I. Antioxidant system in adaptation to intermittent hypoxia. *J Biol Sci.* 2010; 10(6): 545-54.

Матеріал надійшов до редакції 23.03.2015