

ТІОЛ-ДИСУЛЬФІДНА СИСТЕМА МІТОХОНДРІЙ ЗА ГОСТРОЇ ГІПОКСІЇ ТА ГІПОКСИЧНО-ГІПЕРОКСИЧНОЇ АДАПТАЦІЇ

О. О. ГОНЧАР, І. М. МАНЬКОВСЬКА

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: ogonchar@yandex.ru*

Досліджували вплив гіпоксично-гіпероксичних тренувань (ГГТ) на стан мітохондріального глутатіонового пулу (відновлений, окислений глутатіон, протеїнзв'язаний глутатіон), вміст карбонільних груп та вільних сульфгідрильних груп протеїнів, експресію протеїну ключових антиоксидантних ензимів – глутатіонпероксидази та тіоредоксинредуктази, а також активність глутатіонзалежних ензимів – глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та глутаредоксину в мітохондріях печінки щурів, що зазнали дії гострої гіпоксії. Показано, що запропонований режим ГГТ знижує інтенсивність процесів окисної модифікації протеїнів, активує важливі ланки антиоксидантного захисту мітохондрій, а також впливає на тіол-дисульфідний обмін, редокс-баланс у мітохондріях, модифікує процеси S-глутатіонування/деглутатіонування в мембранах мітохондрій.

Ключові слова: гіпоксія–гіпероксія, мітохондрії, окисна модифікація протеїнів, глутатіонова система, S-глутатіонування.

Відомо, що багаторазові короткі експозиції гіпоксії–реоксигенації в процесі переривчастої гіпоксії відповідають стану «гіпоксичного прекодиціонування», чий протекторний ефект було відмічено низкою авторів в різних тканинах і розглядався як одна з форм адаптації до наступної дії екстремальних чинників – ішемії, стресу, фізичного навантаження [1, 2]. Зараз пропонується багато методів прекодиціонування, які модулюють мітохондріальне дихання, продукцію АТР, транспорт іонів та ін. Однак особливу увагу привертають ті підходи, що дозволяють обмежувати надмірне посилення вільнорадикальних процесів за рахунок активації власних ендогенних захисних систем організму, зокрема такі як інтервальні гіпоксичні впливи [3]. Останнім часом особливий інтерес привертає увагу введення в інтервальне гіпоксичне тренування гіпероксичної компоненти, що дозволяє посилити вільнорадикальний сигнал [3, 4]. Було показано, що використання гіпоксично-гіпероксичних тренувань (ГГТ) призводило до формування вираженішого захисного ефекту за коротший час у тканинах печінки, серця і головного мозку порівняно із класичними інтервальними гіпоксично-нормоксичними впливами [1, 3, 4]. Однак механізми, що лежать в основі антиокси-

дантних захисних ефектів ГГТ у субклітинних структурах, зокрема в мітохондріях, ще остаточно не з'ясовано.

Мітохондріям належить центральне місце в клітинній адаптації завдяки їх ролі в метаболічних, енергетичних та вільнорадикальних процесах [5, 6]. Дослідження останніх років показали участь мітохондрій у редокс-реакціях [5, 7]. Одним із механізмів, за допомогою якого мітохондрії перетворюють та контролюють клітинний редокс-сигнал, є тіол-дисульфідний обмін. Це стає можливим завдяки здатності сульфгідрильних груп швидко модифікуватися у відповідь на дію активних форм кисню (АФК) або на зміни у відновлювальному потенціалі багатьох редокс-пар [5, 8]. Мітохондріальний редокс-баланс підтримується двома головними редокс-системами – глутатіоною та тіоредоксиною. Висока редокс-активність глутатіону за одночасної стійкості до окислення киснем, значна концентрація в клітині та можливість зберігати свій відновлений стан роблять його важливим внутрішньоклітинним редокс-буфером [7, 8]. Як антиоксидант глутатіон відіграє головну роль у захисті клітинних структур від окислювального стресу, виступаючи донором електронів для пероксидаз. Ще одна важлива функція глутатіону

пов'язана з утворенням змішаних дисульфідів з протеїнами, що може бути додатковим елементом регуляції біологічних процесів [9, 10]. Зміни у протеїнових тіолах можуть розглядатися як посттрансляційна модифікація, яка включає утворення сульфенових кислот, змішаних дисульфідів протеїнів (S-глутатіонування), між- та внутрішньопропротеїнових дисульфідів тощо. S-глутатіонування поряд з O-фосфорилуванням, глікозилуванням та іншими формами модифікацій, є важливим механізмом регуляції функціонального стану та модуляції активності протеїнів [9]. У цьому регуляторному механізмі важливу роль відіграє мітохондріальний глутаредоксин (Gtx2), який ефективно каталізує реакції S-глутатіонування/деглутатіонування протеїнів [10, 11].

Хоча дослідженням молекулярних механізмів гіпоксичних впливів на клітини присвячено значну кількість робіт, ефекти ГТТ залишаються маловивченими в цілому та зовсім не дослідженими на рівні тіол-дисульфідного обміну. Мало відомо про те, як мітохондрії відповідають на окислювальний стрес різної інтенсивності під час гострої гіпоксії та тривалих сеансів гіпоксії-гіпероксії. У цьому контексті модуляція мітохондріального GSH/GSSG статусу та ступінь S-глутатіонування мітохондріальних протеїнів у процесі ГТТ, а також залучення Gtx2 та тіоредоксин редуктази (TxR2) у формування цих адаптаційних процесів залишаються практично невідомими.

З метою оцінки ролі компонентів тіол-дисульфідної системи мітохондрій щурів у формуванні адаптаційних процесів під час тривалих ГТТ досліджувався стан мітохондріального глутатіонового пулу (відновлений, окислений глутатіон, протеїнзв'язаний глутатіон), вміст окисномодифікованих протеїнів та вільних сульфгідрильних груп протеїнів, а також активність глутатіонзалежних ензимів (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутаредоксину) та тіоредоксинредуктази в мітохондріях печінки щурів, що зазнали дії гострої гіпоксії після ГТТ.

Матеріали і методи

Експерименти проведено на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 230–250 г, які знаходились на стандартному раціоні віварію. Тва-

рин розділили методом випадкового відбору на 4 групи (по 8 щурів у кожній): 1 – контроль (нормоксія); 2 – гостра гіпоксія (тварини дихали гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 7% O₂ в азоті, протягом 45 хв) (ГТ); 3 – гіпоксично-гіпероксичне тренування (протягом 21 дня тварини дихали гіпоксичною та помірно гіпероксичною газовими сумішами по 60 хв щоденно, з чергуванням інтервалів гіпоксії-гіпероксії кожні 5 хв. Гіпоксична суміш містила 10% O₂, гіпероксична – 30% O₂ в азоті) (ГТТ); 4 – гостра гіпоксія після гіпоксично-гіпероксичних тренувань (ГТТ+ГТ). Сеанси інтервальних ГТТ відбувалися в герметичних нормобаричних камерах, де підтримувалась постійна кімнатна температура. З метою поглинання виділеного вуглекислого газу і водяних парів у камерах використовували адсорбент. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом відразу після експерименту. Тварин утримували та маніпулювали з ними здійснювали відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментах та з іншою науковою метою (Страсбург, 1985).

Печінку, видалену з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-им розчином NaCl. Усі маніпуляції проводили при температурі 0–4 °C. Мітохондрії з гомогенатів печінки одержували методом диференційного центрифугування. Середовище видалення мітохондрій містило 250 мМ сахарози, 10 мМ трис/HCl (pH 7,6), 1 мМ EGTA та 0,5% БСА. Мітохондрії відмивали та ресуспендували в середовищі, яке не містило в своєму складі EGTA та БСА. Мітохондріальні протеїни солюбілізували шляхом додавання в суспензію мітохондрій 0,1% розчину Тритон X-100 (кінцева концентрація Тритон X-100 становила 0,01%). Вміст протеїну визначали за методом Лоурі [12].

Активність мітохондріальної глутатіонредуктази (ГР, 1.6.4.2) оцінювали спектрофотометрично за зменшенням вмісту NADPH за 1 хв на 1 мг протеїну за довжини хвилі 340 нм [13]. Активність селензалежної глутатіонпероксидази (ГП, 1.11.1.9) визначали реєстрацією швидкості окислення NADPH у присутності відновленого глутатіону, пероксиду водню та надлишку глутатіонредуктази (2,4 U/мл (14). Активність мітохондріального глутаредоксину (Gtx2, 1.20.4.1) визначали у 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,4), що містив 0,2 М NADPH, 0,7 мМ

β -гідроксіетилен дисульфід, 0,5 мМ глутатіону, 0,4 U/мл глутатіонредуктази. Зменшення вмісту NADPH у середовищі інкубації реєстрували при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) протягом 5 хв [15]. Кількість вільних сульфгідрильних (-SH) груп протеїнів (протеїн-SH) досліджували методом [16]. Вміст різних форм глутатіону вивчали в гомогенатах мітохондрій печінки, що було виготовлено на 5%-й 5-сульфосаліцилової кислоті. Концентрацію відновленого глутатіону (GSH) досліджували за реакцією з 5,5-дитіобіс-(2-нітробензойною) кислотою в присутності 0,3 мМ NADPH та 2 U/мл глутатіонредуктази. Окислений глутатіон (GSSG) визначали в присутності 2-вінілпіридину [17]. Одержані дані використовували для розрахунку відношення відновленого та окисненого глутатіону. Протеїнзв'язаний глутатіон (протеїн-SSG) вивчали методом [16], враховуючи здатність 1%-го боргідриду натрію вивільнювати глутатіон зі зв'язку із протеїнами. Кількість вивільненого глутатіону в супернатанті визначали за методом [17]. В суспензії мітохондрій досліджували окисну модифікацію протеїнів (ОМП) за вмістом карбонільних груп [18]. Про ступінь ОМП висновок робили за кількістю 2,4-динітрофенілгідразонів, визначених на спектрофотометрі за довжини хвилі 370 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $22 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.

Рівень експресії протеїнів глутатіонпероксидази та тіоредоксинредуктази (TxR, 1.8.1.9) в мітохондріальній фракції печінки визначали за допомогою Western-blot-аналізу. Протеїни розділяли у 12%-му поліакриламідному гелі на обладнанні BioRad та переносили на PVDF мембрану методом електроелектролізу. Застосовували первинні моноклональні антитіла до ГП, TxR2 (1 : 500) фірми Santa Cruz Biotechnology (США), β -актину (1 : 5000), Sigma-Aldrich Co (США) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (1 : 2000, Sigma-Aldrich Co (США)). Рівномірність нанесення зразків протеїнів встановлювали за результатами інкубації мембран з антитілами до β -актину («housekeeping» протеїнів), експресія якого вважається приблизно однаковою в усіх типах клітин. Кількісний розрахунок одержаних імуноблотів проводили шляхом їх сканування та обробки комп'ютерною програмою GelPro. Досліди повторювали тричі із трьома паралельними постановками для кож-

ного варіанта експериментальних і контрольних умов.

Результати досліджень оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою програми «Origin 7.0». Вірогідність розходжень між групами порівняння було визначено методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test).

Результати та обговорення

Відомо, що в умовах кисневого дефіциту мітохондрії є одним з основних джерел утворення вільних радикалів, гіперпродукція яких здатна пошкоджувати будь-які макромолекули клітин (протеїни, ДНК, ліпіди). З іншого боку, самі мітохондрії можуть бути мішенями для цих атак, і тільки наявність ефективного антиоксидантного захисту дозволяє підтримувати концентрацію агресивних кисневих метаболітів на безпечному рівні [1, 3]. Як показали результати наших досліджень, гостра гіпоксія спричинювала інтенсифікацію окисних процесів у мітохондріях печінки щурів, про що свідчить значне зростання вмісту карбонільних груп протеїнів на 58% порівняно з контролем ($P < 0,05$) (рис. 1). Відомо, що за різних патологічних станів саме протеїни, а не ліпіди і нуклеїнові кислоти, є первинними і головними мішенями для АФК, а їх окисна модифікація розглядається як один із надійних маркерів окисного стресу, оскільки продукти ОМП стабільніші порівняно із продуктами пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) [19]. Окисній модифікації піддаються майже всі амінокислотні залишки, що може спричинювати утворення внутрішньо- і міжмолекулярних зшивок, агрегацію та фрагментацію протеїнів, зміну їхньої гідрофобності, чутливості до протеолізу, а головне – істотно впливати на активність ензимів аж до повної їх інактивації [20]. Негативний ефект від зростання вмісту окисномодифікованих протеїнів у клітині, за думкою деяких авторів, пов'язаний з тим, що самі ОМП здатні бути додатковим джерелом вільних радикалів, виснажувати запаси таких антиоксидантів, як аскорбінова кислота та глутатіон [19, 20].

У нашому дослідженні розвиток окисного стресу під час гострої гіпоксії призводив до зниження антиоксидантного потенціалу мітохондрій: концентрація GSH зменшувалася в середньому на 19% ($P < 0,05$), в той час як вміст

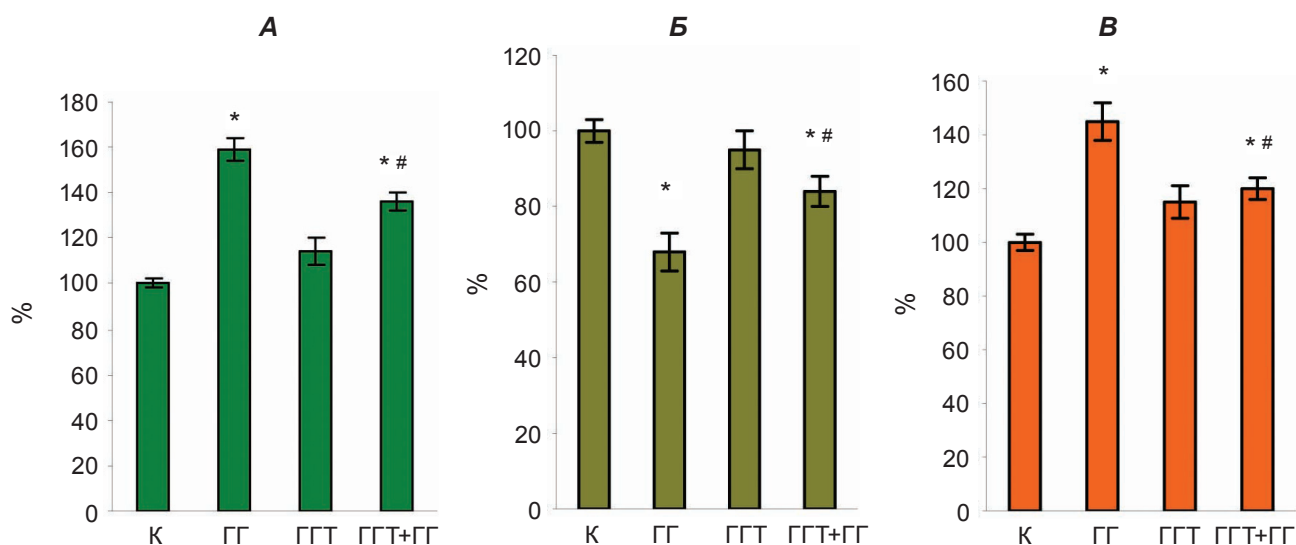


Рис. 1. Вміст карбонільних груп (А), вільних сульфгідрильних груп протеїнів (Б) та протеїнзв'язаного глутатіону (В) в мітохондріях печінки щурів в умовах гострої гіпоксії та гіпоксично-гіпероксичного тренування (показник у контрольних групах тварин прийнято за 100%). К – контроль; ГГ – гостра гіпоксія; ГГТ – гіпоксично-гіпероксичне тренування; ГГТ + ГГ – гостра гіпоксія після гіпоксично-гіпероксичного тренування. * $P < 0,05$ відносно контролю; # $P < 0,05$ відносно гострої гіпоксії

GSSG був на 78% ($P < 0,05$) вище відповідних контрольних значень (таблиця). Відношення GSH/GSSG, що характеризує міру виявлення окисного стресу [8], було у 2 рази нижче за контроль. Ці дані збігаються з повідомленнями, згідно з якими гіпоксія високого ступеня здатна виснажувати запаси GSH у мітохондріях печінки, а також спричинювати короточасне падіння внутрішньоклітинного рівня GSH в ендотеліальних та альвеолярних клітинах щурів [21]. За умов окисного стресу зміни у співвідношенні GSH/GSSG здатні регулювати редокс-стан протеїнових тіолів. У нормі, як правило, процес відновлення змішаних дисульфідів є пріоритетним, однак у разі зниження концентрації GSH, а також підвищення рівня GSSG процес утворення змішаних дисульфідів протеїнів може переважати над їх відновленням [5].

У нашій моделі гострої гіпоксії зниження редокс-потенціалу тіол-дисульфідної системи мітохондрій супроводжується підвищенням вмісту змішаних дисульфідів протеїнів на фоні зниження кількості вільних SH-груп (в середньому на 45 та 32% відповідно, $P < 0,05$) (рис. 1). Відомо, що поряд з ОМП, зменшення вільних тіолових груп, належить до головних молекулярних механізмів, що призводять до структур-

них змін у протеїнах [5, 8]. Участь глутатіону в цих реакціях пов'язана з утворенням змішаних дисульфідів між тіоловими групами протеїнів та GSH, при цьому цей ефект є оборотним. Після зняття прооксидантного навантаження звичайно відбувається репарація функціональних SH-груп протеїнів шляхом від'єднання GSH [9]. S-глутатіонування функціональних редоксчутливих SH-груп цистеїну в протеїнах захищає їх від окисної деградації активними формами кисню вже на стадії сульфенової кислоти (Cys-SOH), з якою і реагує GSH. Це попереджає подальше окислення цистеїну до сульфїнової (Cys-SO₂H) та сульфонової (Cys-SO₃H) кислот або участі сульфенату в утворенні внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків у протеїнах [5, 9]. Ціла низка протеїнів, таких як шаперони, протеїни клітинного цитоскелета, регулятори клітинного циклу, ензими та транскрипційні фактори [7, 9] зазнають оборотного S-глутатіонування у разі зміни внутрішньоклітинного редокс-статусу. Grx каталізує процес S-глутатіонування ефективніше, ніж тіоредоксин чи протеїн-дисульфід ізомераза. Важливо зазначити, що Grx2 може бути реактивована як TrxR2, так і GSH [11].

Ми показали, що в умовах гострої гіпоксії Grx та TrxR2 були стійкі до окисного стресу.

Вплив гострої гіпоксії та гіпоксично-гіпероксичного тренування на стан глутатіонового пулу та активність глутатіонзалежних ензимів мітохондрій печінки щурів ($M \pm m$)

Групи тварин	GSH, нмоль/ мг протеїну	GSSG, нмоль/ мг протеїну	GSH/GSSG	Глутатіон пероксидаза, нмоль/NADPH хв-мг протеїну	Глутатіон редуктаза, нмоль NADPH/ хв-мг протеїну	Глутаредоксин, нмоль NADPH/ хв-мг протеїну
Контроль	4,94 ± 0,19	0,230 ± 0,013	21,31 ± 0,44	11,06 ± 1,02	20,17 ± 0,46	4,99 ± 0,10
ГТ	4,16 ± 0,21*	0,410 ± 0,016*	10,28 ± 0,26*	8,49 ± 0,61*	17,03 ± 0,34*	6,24 ± 0,12*
ГТТ	4,86 ± 0,27	0,280 ± 0,016*	17,36 ± 0,21*	13,25 ± 0,86*	22,46 ± 0,84*	5,35 ± 0,11
ГТТ + ГТ	4,81 ± 0,24#	0,330 ± 0,016*#	14,58 ± 0,18*#	11,58 ± 0,55#	20,98 ± 0,55*#	6,02 ± 0,18*

Примітка. ГТ – гостра гіпоксія; ГТТ – гіпоксично-гіпероксичне тренування; ГТТ+ГТ – гостра гіпоксія після гіпоксично-гіпероксичного тренування.
* $P < 0,05$ відносно контролю; # $P < 0,05$ відносно гострої гіпоксії.

Так, експресія протеїну GrxR2 вище за контроль на 40% ($P < 0,05$), а активність Grx2 зростає на 25% ($P < 0,05$) (рис. 2, табл.). Зміни активності Grx2 за цих умов можна пояснити тим фактом, що за окисного стресу, коли істотно зростає рівень GSSG, а відновлення функціонально активних SH-груп в активному центрі Grx2 за допомогою GSH є проблематичним, відновлення окисленої форми Grx2 може відбуватися за рахунок TrxR2 [11]. Як відмічалось іншими авторами, підвищення активності та експресії Grx в умовах окисного стресу є суттєвим для мітохондріального захисту, оскільки цей стійкий до окислення детіолазний ензим може поновлювати активність інших ключових ензимів, таких як АТР-генеруюча глюкозо-3-фосфат дегідрогеназа та H_2O_2 -знешкоджуюча глутатіонпероксидаза [5, 10].

Гостра гіпоксія призводить до зниження активності GSH-залежних ензимів – ГР та ГП на 18 та 30% відповідно ($P < 0,05$) (табл.). Кількість протеїну ГП є нижчою за контрольні показники на 11% ($P < 0,05$) (рис. 2). Відомо, що додатковим важливим фактором, який впливає на редокс-середовище матриксу мітохондрій, є баланс між активністю пероксидаз та Mn-SOD [6]. Раніше ми показали, що за умов гострої 7%-ї гіпоксії активність та експресія протеїну Mn-SOD у мітохондріях печінки значно зростає. Така надекспресія Mn-SOD без відповідної активності ГП призводила до акумуляції H_2O_2 , що впливало, у свою чергу, на мітохондріальний редокс-статус, спричинювало додаткові оксидативні порушення і, як наслідок цього, мітохондріальну дисфункцію [2, 4].

ГТТ значно знижує інтенсивність окисних процесів у мітохондріях печінки щурів, що зазнали впливу гострої гіпоксії. Так, у тварин 4-ї групи ми рестрували зниження вмісту карбонільних груп на 23% ($P < 0,05$) (рис. 1), а також зростання співвідношення GSH/ GSSG на 42% ($P < 0,05$) (табл.) на відміну від нетренованих щурів. Про збереження глутатіонового пулу в мітохондріях щурів, що зазнали тестуючого впливу гострої гіпоксії після ГТТ, свідчить також і зростання активності глутатіонзалежних ензимів ГП та ГР на 36 та 23% відповідно ($P < 0,05$) на відміну від тварин 2-ї групи. При цьому активність Grx2 залишається на рівні показників 2-ї групи (табл.). Тривалий гіпоксично-гіпероксичний вплив призводить до зростання кількості протеїну ГП на

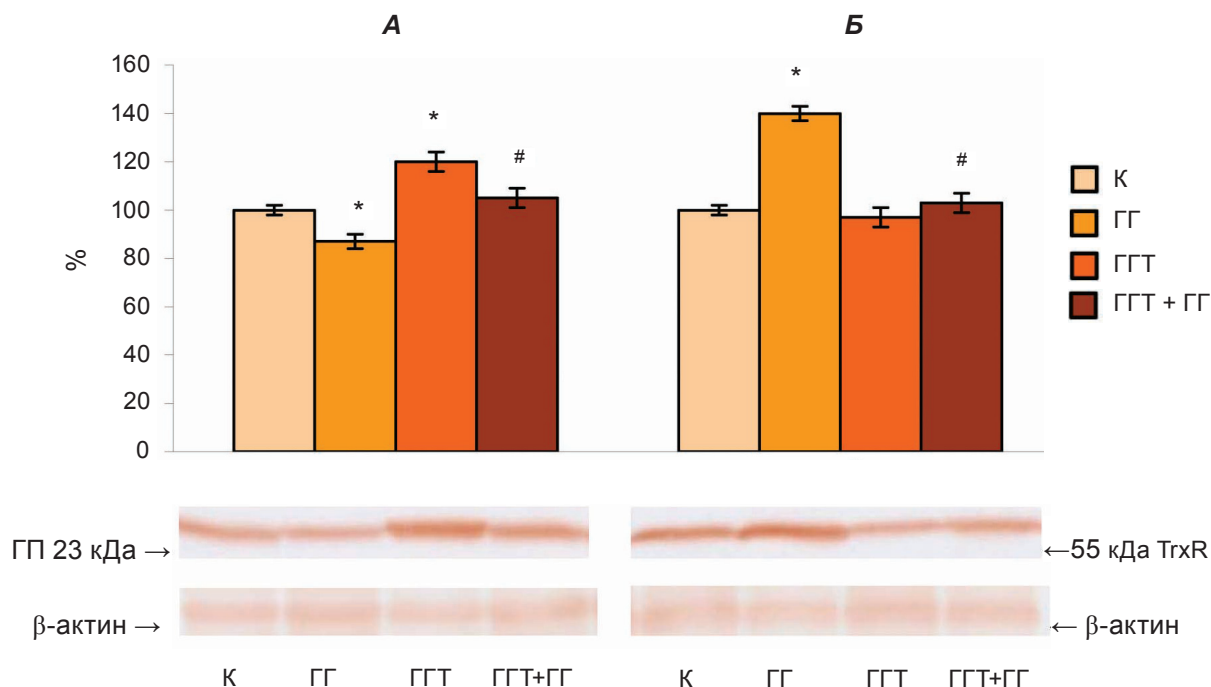


Рис. 2. Відносні показники кількості протеїнів глутатіонпероксидази (А) та тіоредоксинредуктази (Б) в мітохондріях печінки у тварин різних груп (рівень експресії цих протеїнів у тварин контрольної групи прийнято за 100%) ($M \pm t$, $n = 8$). * $P < 0,05$ відносно контролю; # $P < 0,05$ відносно гострої гіпоксії. Розшифровка скорочень – дивись рис. 1

20% ($P < 0,05$) порівняно з контролем і на 33% ($P < 0,05$) порівняно із тваринами 2-ї групи. У тварин 4-ї групи цей показник зберігається на рівні контрольних значень. В той самий час вміст протеїну TrxR2 в тварин 3- та 4-ї груп не відрізняється від контрольних значень і є значно нижчим, ніж у тварин 2-ї групи (рис. 2).

Зазвичай тіольні антиоксиданти присутні в мітохондріях у функціонально активному, а саме відновленому стані, і беруть активну участь в її захисті від окисного стресу [7]. Механізми цього захисту можуть бути двоякими. З одного боку, вони нейтралізують АФК або діючи безпосередньо як пастки вільних радикалів, або забезпечуючи роботу специфічних пероксидаз. З іншого боку, вони відновлюють низку окислених (завдяки окисному стресу) протеїнів, повертаючи тим самим функціональну активність широкому спектру ензимів, рецепторів та транскрипційних факторів [5, 9]. Після ГГТ у тварин 4-ї групи ми реєстрували зниження кількості протеїнів зв'язаного глутатіону на фоні зростання вмісту вільних сульфгідрильних груп протеїнів (рис. 1). Підвищення рівня GSH за значної активності Grx2 може свідчити про

перевагу процесу деглутатіонування в умовах застосування ГГТ (табл.).

Відомо, що глутаредоксини функціонально сполучені з ГР та GSH. У нормі в Grx-залежній системі перенесення електронів відбувається від NADPH-залежної ГР на GSSG з утворенням GSH, котрий, у свою чергу, відновлює окислений глутаредоксин [10, 11]. Враховуючи те, що у тварин 4-ї групи, на відміну від тварин 2-ї групи, активність ГР та вміст GSH зростає, а кількість протеїну TrxR2 знижується на фоні збереження значної активності Grx2, можна припустити, що у разі застосування ГГТ відновлення окисленої форми Grx2 може відбуватися за рахунок GSH на відміну від стану гострої гіпоксії.

Отже, одержані нами результати свідчать, що запропонований режим ГГТ сприяє збереженню глутатіонового пулу мітохондрій, активує та стимулює протеїновий синтез глутатіонзалежних ензимів, знижує інтенсивність процесів ОМП за гострої гіпоксії, а також позитивно впливає на тіолдисульфідний обмін у мітохондріях (за рахунок підтримання вмісту вільних сульфгідрильних груп протеїнів). ГГТ здатні впливати на про-

цеси S-глутатіонування/деглутатіонування в мембранах мітохондрій у відповідь на зміни у співвідношенні GSH/ GSSG за участю Grx2 та TrxR2. Таким чином, ми показали, що одним із провідних клітинних і молекулярних механізмів впливу гіпоксично-гіпероксичних тренувань на формування адаптації до гіпоксії може бути їх модулююча роль в редокс-реакціях тиол-дисульфідної системи мітохондрій, яка обмежує розвиток оксидативних пошкоджень мітохондрій і, як наслідок, мітохондріальної дисфункції під час наступної дії стресорних чинників.

ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНАЯ СИСТЕМА МИТОХОНДРИЙ ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ И ГИПОКСИ-ГИПЕРОКСИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ

О. А. Гончар, И. Н. Маньковская

Институт физиологии им. А. А. Богомольца
НАН Украины, Киев;
e-mail: ogonchar@yandex.ru

Исследовалось влияние гипоксии-гипероксичных тренировок (ГТТ) на состояние митохондриального глутатионового пула (восстановленный, окисленный глутатион, протеинсвязанный глутатион), содержание карбонильных групп и свободных сульфгидрильных групп протеинов, экспрессию протеинов ключевых антиоксидантных энзимов – глутатионпероксидазы и тиоредоксинредуктазы, а также активность глутатионзависимых энзимов – глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутаредоксина в митохондриях печени крыс, подвергшихся воздействию острой гипоксии. Показано, что предложенный режим ГТТ снижает интенсивность процессов окислительной модификации протеинов, активует важные звенья антиоксидантной защиты митохондрий, а также влияет на тиол-дисульфидный обмен, редокс-баланс в митохондриях, модифицирует процессы S-глутатионилирования/деглутатионилирования в мембранах митохондрий.

Ключевые слова: гипоксия–гипероксия, митохондрии, окислительная модификация протеинов, глутатионовая система, S-глутатионилирование.

MITOCHONDRIAL THIOL-DISULFIDE SYSTEM UNDER ACUTE HYPOXIA AND HYPOXIC-HYPEROXIC ADAPTATION

O. A. Gonchar, I. N. Mankovska

Bogomoletz Institute of Physiology, National
Academy of Sciences of Ukraine;
e-mail: ogonchar@yandex.ru

The authors investigated the state of mitochondrial glutathione pool (reduced and oxidized glutathione, protein-GSH mixed disulfides), content of carbonyl groups and free sulfhydryl groups of proteins, protein expression of key mitochondrial antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase and thioredoxin reductase as well as activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutaredoxin in the liver mitochondria of rats exposed to acute hypoxia after prolonged hypoxic-hyperoxic training (HHT). It was shown that the preliminary HHT reduced the intensity of proteins oxidative modification under acute hypoxia, activated the mitochondrial antioxidant defense as well as affected the thiol-disulfide exchange, redox balance in mitochondria, modulated the S-glutathionylation/deglutathionylation process in mitochondria membranes.

Key words: hypoxia-hyperoxia, mitochondria, proteins oxidative modification, glutathione system, S-glutathionylation.

1. Сазонтова Т. Г., Анчишикина Н. А., Жукова А. Г. и др. // Физиол. журн. – 2008. – **54**, № 2. – С. 18–32.
2. Gonchar O., Mankovskaya I. // J. Biol. Sci. – 2010. – **10**. – P. 545–554.
3. Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Под ред. Л. Д. Лукьяновой, И. Б. Ушакова. – М.: Наука, 2004. – С. 112–137. – 2011. – **5**. – P. 342–351.
5. Murphy M. // Antioxid. Redox Signal. – 2012. – **16**. – P. 476–495.
6. Cadenas E., Boveris A. // Handb. Environ. Chem. – 2005. – **2**, Part 1. – P. 219–234.
7. Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. // Biochem. Pharm. – 2002. – **64**. – P. 1057–1064.
8. Gilbert H. F. // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. – 1990. – **63**. – P. 69–172.

9. *Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D. et al.* // *Free Rad. Biol. Med.* – 2007. – **43**. – P. 883–898.
10. *Beer S., Taylor E., Brown S. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **12**. – P. 47939–47951.
11. *Gravina S., Mieyal J.* // *Biochemistry.* – 1993. – **32**. – P. 3368–3376.
12. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. I. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**. – P. 265–275.
13. *Методы биохимических исследований /* Под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – С. 181–183.
14. *Lawrence R., Burk R.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1976. – **71**. – P. 952–958.
15. *Mieyal J., Starke D., Gravina S. et al.* // *Biochemistry.* – 1991. – **30**. – P. 6088–6097.
16. *Burchill B., Oliver J., Pearson C. et al.* // *J. Cell Biol.* – 1978. – **76**. – P. 439–447.
17. *Anderson M.* // *Methods Enzymol.* – 1985. – **113**. – P. 548–551.
18. *Levine R. L., Garland D., Oliver C. N. et al.* // *Methods Enzymol.* – 1990. – **186**. – P. 464–478.
19. *Berlett B. S., Stadtman E. R.* // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**. – P. 20313–20316.
20. *Dean R. T., Fu S., Stocker R. et al.* // *Biochem. J.* – 1997. – **324**. – P. 1–18.
21. *Mansfield K., Simon M., Keith B.* // *J. Appl. Physiol.* – 2004. – **97**. – P. 1358–1366.

Отримано 28. 03.2013