

Кирова Ю.И.

Роль системы глутатиона в регуляции окислительно-восстановительного статуса коры головного мозга крыс при гипоксии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Проведен сравнительный анализ влияния разных режимов гипобарической гипоксии (14% O₂, 10,5% O₂ и 8% O₂, 1 час; 15-дневный курс) на параметры системы глутатиона, интенсивность процессов свободнорадикального и перекисного окисления в коре головного мозга (КГМ) крыс с различной генетически-детерминированной устойчивостью к острой гипоксии. В условиях нормоксии в КГМ низкоустойчивых (НУ) крыс базовое содержание окисленного глутатиона и гидроперекисных метаболитов было на 20% ниже в сравнении с высокоустойчивыми (ВУ). Базовая активность ферментов цикла глутатиона в КГМ НУ крыс — глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы — была на 30% ниже, чем у ВУ. Данные свидетельствуют о более эффективной антиоксидантной защите ткани КГМ НУ крыс в сравнении с ВУ животными. Фенотипические различия в окислительно-восстановительных свойствах ткани КГМ у двух фенотипов крыс сохраняются и при гипоксических воздействиях. Показано, что эффективность системы глутатиона в регуляции редокс-гомеостаза КГМ зависит как от тяжести и длительности гипоксического воздействия, так и от индивидуальной переносимости животными гипоксии, т.е. генетически детерминирована. В КГМ НУ крыс эта система сохраняет свои регуляторные свойства в более широком диапазоне сниженных значений pO₂ сравнительно с ВУ животными и при более длительном их применении. Благодаря этому, в КГМ НУ крыс (но не ВУ) предотвращается либо ослабляется активация свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса при однократном и курсовом применении гипоксических воздействий. Все это делает принципиально важным выбор режимов гипоксического воздействия при терапевтическом применении преко кондиционирования. Оптимальными, по-видимому, следует считать такие гипоксические воздействия, которые не сопровождаются появлением признаков окислительного стресса.

Ключевые слова: гипобарическая гипоксия; крысы с высокой и низкой устойчивостью к острой гипоксии; неокортекс; антиоксидантная система глутатиона; перекисное окисление липидов

Kirova Yu.I.

Role of the glutathione system in regulation of redox status in the rat cerebral cortex under hypoxia

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia.

The study compared effects of different hypobaric hypoxia regimens (14% O₂, 10.5% O₂, and 8% O₂; 1 hour; 15 days) on parameters of the glutathione system, intensity of free radical oxidation, and intensity of lipid peroxidation in cerebral cortex (CC) of rats with different, genetically predetermined resistance to acute hypoxia. In normoxia, baseline concentrations of oxidized glutathione (0.155 ± 0.011 nmol/mg protein) and hydroperoxide metabolites (50.4 ± 2.62 cumene hydroperoxide equivalents/g tissue) were 20% lower in CC of low-resistance (LR) rats than in high-resistance (HR) rats (0.191 ± 0.013 nmol/mg protein; 63.0 ± 3.46 cumene hydroperoxide equivalents/g tissue, respectively). Baseline activities of the glutathione cycle enzymes, glutathione peroxidase (31.2 ± 1.59 nmol/min/mg protein) and glutathione reductase (28.5 ± 1.49 nmol/min/mg protein), were 30% lower in LR rat CC than in HR rat CC (47.0 ± 2.41 ; 43.3 ± 2.26 nmol/min/mg protein, respectively). These data suggested more efficient antioxidant defense of CC tissue in LR rats than in HR rats. The phenotypic difference in CC tissue redox properties between two rat phenotypes remained in hypoxia. The efficiency of glutathione system in regulation of CC redox homeostasis was shown to depend on both severity and duration of hypoxic exposures and on individual tolerability of hypoxia, i.e., this efficiency was genetically predetermined. The glutathione system maintains its regulatory properties in a broader range of lowered pO₂ values and during longer hypoxic exposures in LR rat CC than in HR rat CC. For this reason, activation of free radical processes and development of oxidative stress induced by single or repeated hypoxic exposures are prevented or alleviated in LR rat CC but not in HR rat CC. The obtained data strongly justify the need for selection of hypoxic exposure regimens for therapeutic hypoxic preconditioning. Apparently the hypoxic exposures not associated with signs of oxidative stress should be considered optimum.

Key words: hypobaric hypoxia; rats with low and high resistance to acute hypoxia; cerebral cortex; glutathione antioxidant system; lipid peroxidation

Для корреспонденции: Кирова Юлия Игоревна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: bioenerg@mail.ru

Низкомолекулярный тиол глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин; GSH) содержится в высоких концентрациях (1–10 мМ) в клетках всех аэробных организмов и, благодаря сульфгидрильной группе (SH-) цистеина и ее способности к окислительно-восстановительным модификациям, играет центральную роль в регуляции внутриклеточного редокс-гомеостаза, тиол-дисульфидного состояния и функциональной активности структурных, ферментативных и сигнальных белков клетки [1, 2].

Глутатион определяется во всех компартаментах клетки, проявляет собственную, не связанную с ферментами, антирадикальную и антипероксидную активность. Однако в полной мере антиоксидантная функция глутатиона реализуется системой глутатион-зависимых ферментов, включающей глутатионпероксидазу (ГПО), глутатионтрансферазу (ГТ) и глутатионредуктазу (ГР). ГПО восстанавливает H_2O_2 и органические гидроперекиси, а ГТ — главным образом, гидрофобные гидропероксиды с образованием окисленного глутатиона (GSSG). Ревосстановление GSSG катализирует НАДФН-зависимый фермент ГР. Таким образом, функциональная активность антиоксидантной системы глутатиона лимитируется скоростью восстановления НАДФ в пентозофосфатном цикле окисления глюкозы. GSH, GSSG, ГПО и ГР являются элементами редокс-цикла глутатиона [3, 4]. Кроме ГПО, ГТ, ГР к основным ферментам метаболизма глутатиона относится глутаредоксин. Фермент поддерживает сульфгидрильный (тиоловый) гомеостаз клеток, используя GSH для восстановления в белках окисленных остатков цистеина (Cys-SOH, Cys-SO₂H), внутри/межмолекулярных дисульфидных связей в белках и смешанных глутатион-белковых дисульфидах (PrSSG) [2].

В физиологических условиях система глутатион-зависимых ферментов обеспечивает эффективное поддержание внутриклеточного редокс-гомеостаза, сульфгидрильного статуса клеток и сохранение высокой цитозольной концентрации GSH.

В условиях тяжелых гипоксических/ишемических воздействий развивается дисфункция системы глутатиона: снижается содержание общего глутатиона, увеличивается уровень GSSG, окисленных и S-глутатионилированных белков (глутатион-белковых дисульфидов) [5]. Главными мишенями S-глутатионилирования (обратимой инактивации) являются тиоловые ферменты (протеинфосфатаза 2A, тирозинфосфатаза 1B, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа, митохондриальный комплекс I) и редокс-чувствительные транскрипционные факторы (HIF-1, NF- κ B) [2, 4]. С S-глутатионилированием связана аккумуляция неправильно свернутых или развернутых белков, а также активация апоптотических путей [6].

Однако очевидно и то, что гипоксия, в зависимости от тяжести и продолжительности воздействия, может оказывать противоположное влияние на редокс-статус клетки и вызывать либо активацию, либо ингибирование сигнальных тиоловых белков [7, 8]. В результате может наблюдаться как увеличение восстановленности в системе глутатиона (увеличение GSH, отношения GSH/GSSG, снижение генерации O_2^- и H_2O_2), так и снижение GSH и отношения GSH/GSSG за счет увеличения количества окисленной формы — GSSG, которая считается маркером окислительного стресса [9–12]. Систематические сравнительные исследования активности глутатионовой системы при разных режимах гипоксии отсутствуют.

Ранее нами было показано, что по мере усиления тяжести гипоксического воздействия реактивность антиоксидантной системы клеток неокортекса меняется. При 10% O_2 наблюдается активация и усиление защитных механизмов, ограничивающих инициацию свободнорадикального окисления. При 8% O_2 развивается истощение отдельных наиболее уязвимых звеньев антиоксидантной системы неокортекса [13–16].

Существует и еще один очень важный аспект проблемы. Ранее нами было показано, что у животных с генетически детерминированной различной толерантностью к гипоксии различные режимы гипоксических воздействий неодинаково влияют на параметры системы глутатиона и сопряженные свободно-радикальные процессы [7, 13, 15]. В мировой литературе публикации по этому вопросу отсутствуют.

Цель исследования, которое посвящено сравнительное изучение воздействия разных режимов гипобарической гипоксии и их длительности на параметры редокс-цикла глутатиона в коре головного мозга (КГМ) крыс с разной исходной толерантностью к острой гипоксии.

Методика

Работа проведена на белых беспородных крысах-самцах при соблюдении требований по использованию животных для экспериментальных исследований, утвержденные Российским национальным комитетом по биоэтике Российской Академии наук. Животных предварительно тестировали на устойчивость к острой гипобарической гипоксии (ОГБГ), моделируемой в барокамере [17].

Группу высокоустойчивых (ВУ) животных составили особи, сохраняющие жизнеспособность на критической высоте (11 500 м) в течение 10 мин и более. Группу низкоустойчивых (НУ) животных составили особи, признаки асфиксии у которых выявлялись в этих условиях в течение 1–3 мин [18]. Период между тестированием животных на устойчивость к ОГБГ и последующим воздействием разных режимов гипобарической гипоксии (ГБГ) составлял не менее 4 нед.

При проведении экспериментов применяли режимы ГБГ разной тяжести:

- 1) 526 торр (эквивалентно 14% O_2 во вдыхаемом воздухе или подъему на высоту 3000 м; ГБГ₃₀₀₀);
- 2) 380 торр (эквивалентно 10,5% O_2 во вдыхаемом воздухе или подъему на высоту 5000 м; ГБГ₅₀₀₀);
- 3) 290 торр (эквивалентно 8% O_2 во вдыхаемом воздухе или подъему на высоту 7000 м; ГБГ₇₀₀₀).

Одночасовые гипоксические воздействия разной тяжести проводились ежедневно на протяжении 15 сут. Контрольные крысы находились в барокамере при нормальном атмосферном давлении (21% O_2).

Декапитацию животных и выделение материала для исследования (неокортекс) производили через 1 мин и 24 ч после 1, 3, 8 и 15 гипоксических воздействий.

Для оценки интенсивности свободнорадикального и перекисного окисления в ткани КГМ исследовали: содержание гидроперекисных соединений (ГП) [19], диеновых конъюгатов полиненасыщенных высших жирных кислот (ДК) [20], а также метаболитов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов; ТБК-РП) [21]. В КГМ определяли содержание общего, восстановленного и окисленного глутатиона (G, GSH, GSSG) [22]. Рассчитывали индекс окислительного стресса (IOS) — процент содержания GSSG в общем пуле глутатиона — $IOS = 100 \times (2 \times GSSG / G)$ [23]. Определяли активность ферментов цикла глутатиона: глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) [24, 25].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 6,0» с использованием U-критерия Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента. Значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В условиях нормоксии содержание G, GSH, отношение GSH/GSSG, IOS, а также содержание продуктов ПОЛ (ДК и ТБК-РП) в КГМ НУ и ВУ к острой гипоксии крыс существенно не отличались. Однако базовый уровень GSSG и ГП в КГМ ВУ крыс был на

20% выше, чем у НУ; активность ферментов глутатионового цикла ГПО и ГР в КГМ ВУ крыс была на 35% выше в сравнении с НУ крысами (таблица). Установленные различия свидетельствуют о более высокой свободнорадикальной активности в ткани КГМ ВУ крыс в нормоксических условиях и сдвиге редокс-равновесия в сторону большей окисленности сравнительно с НУ. Таким образом, работа системы глутатиона в КГМ НУ крыс в условиях нормоксии более отрегулирована и сбалансирована, что обеспечивает более эффективную антиоксидантную защиту ткани мозга.

Следует отметить, что более высокая активность ГПО в КГМ ВУ крыс может отражать лучшую оксигенацию мозга у этих животных сравнительно с НУ крысами. Действительно, согласно данным Merante и соавт., экспрессия цитоплазматической изоформы ГПО (ГПО1) кислородзависима. Ген ГПО1 содержит два O_2 -отвечающих элемента, которые активируют транскрипцию в ответ на увеличение в клетке O_2 -уровня [26]. Более высокая оксигенация КГМ ВУ крыс в нормоксических условиях, в свою очередь, может определять более высокий уровень окислительного метаболизма и свободнорадикальной активности в этой ткани и быть причиной более высокого в ней базового уровня GSSG и перекисных метаболитов. Известно, например, что H_2O_2 непрерывно продуцируется в физиологических условиях митохондриями, пероксисомами, оксидазами эндоплазматического ретикулума и поддерживается на низком уровне различными пероксидазами [4].

Разные режимы гипоксических воздействий приводили к неодинаковым изменениям параметров системы глутатиона и ПОЛ в КГМ НУ и ВУ крыс. Так в КГМ НУ крыс сразу (через 1 мин) после окончания наиболее щадящего однократного гипоксического воздействия (14% O_2 , 1 ч) наблюдалось снижение содержания GSSG на 45-50%, IOS на 50% (рис. 1А), двукратное увеличение отношения GSH/GSSG. Активность ферментов глутатионового цикла (ГПО, ГР), содержание гидроперекисей и

Таблица

Содержание компонентов пула глутатиона, гидроперекисей, продуктов ПОЛ и активность ферментов цикла глутатиона в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях нормоксии

КГМ	G	GSH	GSSG	GSH/GSSG G	IOS	ГПО	ГР	ГП	ДК	ТБК-РП
	мкмоль/г ткани (нмоль/мг белка)				%	нмоль · мин ⁻¹ · мг ⁻¹ белка	экв. СНР · г ⁻¹	нмоль · г ⁻¹ ткани		
НУ	2,74 ± 0,14 (54,8 ± 3,2)	2,42 ± 0,13 (48,4 ± 2,5)	0,155 ± 0,011 (3,1 ± 0,14)	15,61 ± 0,94	11,3 ± 0,67	31,2 ± 1,59	28,5 ± 1,49	50,4 ± 2,62	22,9 ± 1,16	251 ± 14,1
ВУ	2,98 ± 0,18 (59,6 ± 3,5)	2,59 ± 0,16 (51,8 ± 2,7)	0,191 ± 0,013 [#] (3,8 ± 0,19)	13,56 ± 0,82	12,8 ± 0,75	47,0 ± 2,41 ^{##}	43,3 ± 2,26 ^{##}	63,0 ± 3,46 [#]	24,9 ± 1,26	286 ± 16,4

Примечание. [#] — различия между фенотипами ($P < 0,05$); ^{##} — различия между фенотипами ($P < 0,01$)

продуктов ПОЛ (ТБК-РП, ДК) значимо не менялись в этот период (рис. 2А, 3А).

При многократном (курсовом) применении данного гипоксического воздействия сходные по направленности изменениями GSSG сопровождали каждую очередную тренировку, но степень их выраженности в КГМ НУ крыс постепенно уменьшалась (рис. 1А). Все остальные исследованные параметры, характеризующие редокс-статус ткани (ферменты глутатионового цикла, гидроперекиси, продукты ПОЛ) значимо не менялись в КГМ НУ крыс на протяжении всего курса гипокситерапии (рис. 2А, 3А).

Таким образом, наиболее мягкий режим гипоксии, используемый в работе, индуцировал кратковременное снижение окисленности у НУ крыс без существенного изменения других параметров системы глутатиона и сопряженных свободнорадикальных процессов. Все это свидетельствует о сохранении в этих условиях способности системы глутатиона в КГМ НУ крыс к ответной реакции, характерной для фи-

зиологической нормы, направленной на снижение свободно-радикальной активности и сохранение восстановительного фонда клетки, что говорит о сбалансированности ее работы и способности регулировать окислительно-восстановительный гомеостаз клеток.

При увеличении тяжести гипоксии (10,5% O₂, 1 ч) ответная реакция системы глутатиона в коре НУ крыс принципиально менялась. Так, сразу после окончания первого гипоксического воздействия и на протяжении трех последующих воздействий изменения параметров пула глутатиона вообще отсутствовали, в том числе и характерное для мягкой гипоксии снижение GSSG. Однако после 8-го—15-го гипоксического воздействия наблюдалось небольшое (10—15%; рис. 1В) увеличение уровня GSSG и снижение значений GSH/GSSG, коррелирующее со статистически не значимой активацией ГР и ГПО (рис. 3В). Уровень перекисных метаболитов и продуктов ПОЛ в КГМ НУ крыс, тем не менее, значимо не менялся в этих условиях (рис. 2В). Таким об-

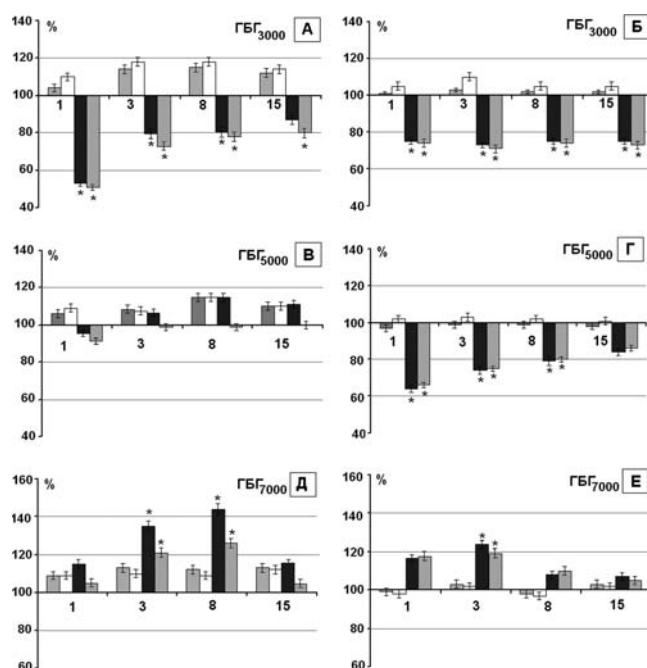


Рис. 1. Динамика параметров пула глутатиона КГМ НУ и ВУ крыс при разных режимах гипоксических воздействий.

А, В, Д — динамика параметров пула глутатиона КГМ НУ крыс в курсе ГБГ₃₀₀₀ (А), ГБГ₅₀₀₀ (В) и ГБГ₇₀₀₀ (Д); Б, Г, Е — динамика параметров пула глутатиона КГМ ВУ крыс в курсе ГБГ₃₀₀₀ (Б), ГБГ₅₀₀₀ (Г) и ГБГ₇₀₀₀ (Е).

По оси абсцисс обозначено количество дней применения однократного гипоксического воздействия (1 мин реоксигенации). По оси ординат — % к контролю (100%). Серые столбики — содержание G (общий глутатион); белые столбики — содержание GSH (восстановленный глутатион); черные столбики — содержание GSSG (окисленный глутатион); заштрихованные столбики — IOS (индекс окислительного стресса); * — данные отличаются от контроля (p < 0,05).

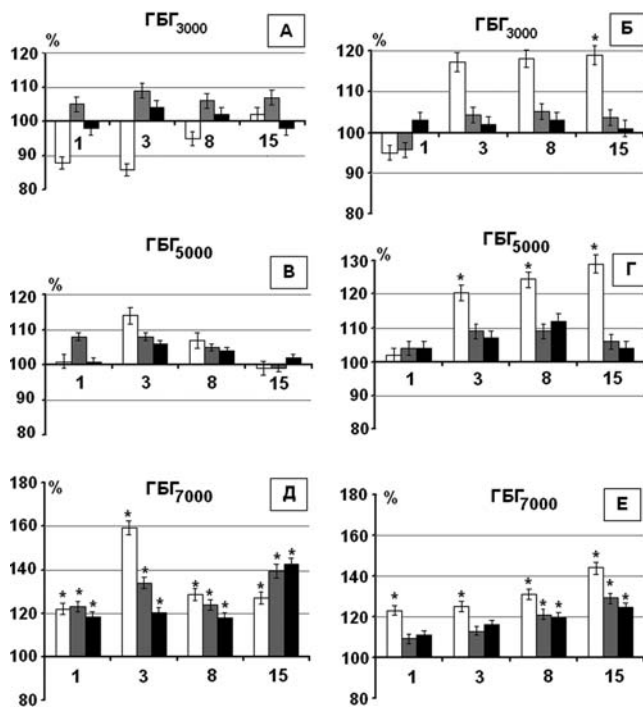


Рис. 2. Динамика содержания ГП и продуктов ПОЛ в КГМ НУ и ВУ крыс при разных режимах гипоксических воздействий.

А, В, Д — содержание ГП и продуктов ПОЛ в КГМ НУ крыс в курсе ГБГ₃₀₀₀ (А), ГБГ₅₀₀₀ (В) и ГБГ₇₀₀₀ (Д); Б, Г, Е — содержание ГП и продуктов ПОЛ в КГМ ВУ крыс в курсе ГБГ₃₀₀₀ (Б), ГБГ₅₀₀₀ (Г), ГБГ₇₀₀₀ (Е).

По оси абсцисс обозначено количество дней применения однократного гипоксического воздействия (1 мин реоксигенации). По оси ординат — % к контролю (100%). Белые столбики — содержание ГП (гидроперекиси); серые столбики — содержание ДК (диеновые конъюгаты полиненасыщенных жирных кислот); черные столбики — содержание ТБК-РП (продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой); * — данные отличаются от контроля (p < 0,05).

разом, при гипоксии средней тяжести ($10,5\% \text{ O}_2$) антиоксидантная функция системы глутатиона у НУ животных сохранялась, также как и способность поддерживать значения параметров пула глутатиона на уровне близком к норме. Однако потеря способности системы к увеличению восстановленности в ответ на 1-е гипоксическое воздействие, а также увеличение уровня окисленного глутатиона при курсовом применении гипоксии свидетельствует о постепенном снижении в этих условиях функциональной активности системы, направленной на поддержание восстановленности внутриклеточной среды.

Применение режима тяжелой гипоксии ($8\% \text{ O}_2$, 1 ч) сопровождалось сразу по окончании 1-го гипоксического воздействия не снижением, а тенденцией к увеличению уровня GSSG в КГМ НУ крыс (рис. 1Д). При этом сохранялось повышенное содержание GSH и отсутствовали изменения в отношении GSH/GSSG, а также IOS. Содержание ГП, продуктов ПОЛ и активность ГР увеличивались на 20% в 1-е сут. реоксигена-

ции (рис. 2Д, 3Д). При курсовом применении данного режима гипоксии содержание GSSG постепенно нарастало и достигало после 8-го применения гипоксии $140\text{—}150\%$ (рис. 1Д). Несмотря на то, что содержание GSH оставалось несколько повышенным, отношение GSH/GSSG снижалось на 25% , а индекс IOS увеличивался на $20\text{—}30\%$ (рис. 1Д). Воздействия тяжелой гипоксии сопровождалась увеличением уровня перекисных метаболитов и продуктов ПОЛ (рис. 2Д), которое имело двухфазную динамику с двумя максимумами: после 3-го (увеличение всех параметров на $25\text{—}60\%$; рис. 2Д) и 15-го гипоксического воздействия (увеличение всех параметров на $25\text{—}40\%$; рис. 2Д). Во всех случаях активность ферментов глутатионовой системы (ГПО, ГР) на протяжении 1-го—8-го гипоксических воздействий также была повышена на $15\text{—}25\%$ (рис. 3Д). Таким образом, в условиях тяжелой гипоксии в КГМ НУ крыс развивался дисбаланс редокс-статуса клеток КГМ: гиперактивация прооксидантных систем [27] и функциональная недостаточность антиоксидантной системы глутатиона [28].

Тем не менее, несмотря на снижение регуляторной роли системы глутатиона при остром дефиците кислорода, в конце курсового применения гипоксических воздействий (15 сеансов) наступал период нормализации параметров пула глутатиона, который совпадал с завершением адаптации к гипоксии НУ животных и формированием у них нового повышенного уровня неспецифической резистентности организма [14—17]. Все это позволяет сделать вывод, что глутатионовая система принимает участие в процессах адаптации к гипоксии при разных режимах гипоксии, но эффективность ее регуляторного влияния в условиях острой гипоксии резко снижена.

Реакция системы глутатиона КГМ ВУ крыс на применение разных режимов гипоксических воздействий в значительной степени отличалась от НУ крыс.

Так, при действии наиболее щадящего режима гипоксии ($14\% \text{ O}_2$, 1 ч), несмотря на то, что сразу после 1-го гипоксического воздействия происходило снижение уровня GSSG на 25% (рис. 1Б), абсолютное содержание GSSG ($3,0 \pm 0,17$ нмоль/мг белка) в КГМ ВУ крыс в раннем постгипоксическом периоде (через 1 мин после окончания гипоксического воздействия) было почти вдвое выше, чем у НУ крыс ($1,6 \pm 0,09$ нмоль/мг белка; $p < 0,01$). Следовательно, восстановительная способность системы глутатиона в КГМ ВУ крыс в этих условиях была менее эффективна в сравнении с НУ. В пользу этого вывода свидетельствует сниженная на $15\text{—}20\%$ активность ГПО и ГР (рис. 3Б). Уровень гидроперекисей и продуктов ПОЛ в первые сутки после гипоксического воздействия значимо не менялся сравнительно с базовым, как и у НУ животных.

При многократном (курсовом) применении данного режима гипоксического воздействия ($14\% \text{ O}_2$, 1 ч) уро-

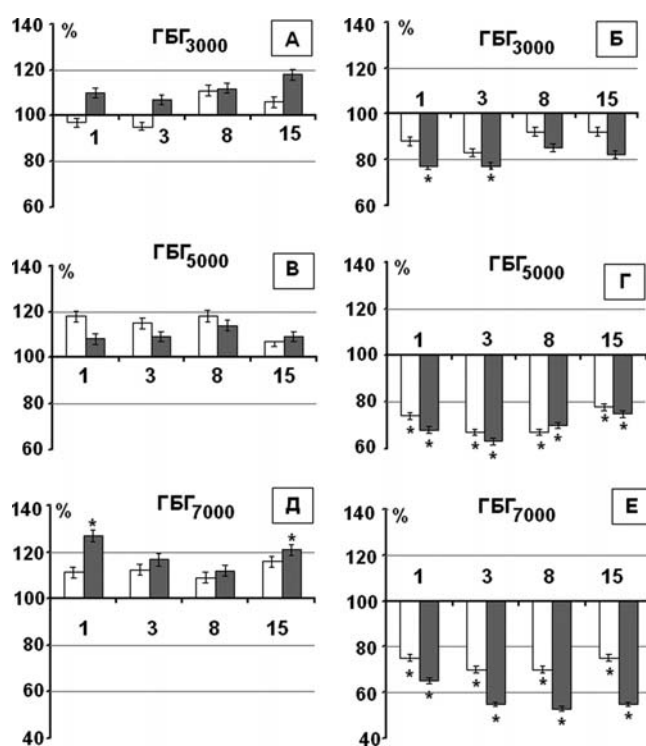


Рис. 3. Динамика активности ГПО и ГР в КГМ НУ и ВУ крыс при разных режимах гипоксических воздействий.

А, В, Д — динамика активности ГПО и ГР в КГМ НУ крыс в курсе ГБГ₃₀₀₀ (А), ГБГ₅₀₀₀ (В) и ГБГ₇₀₀₀ (Д);

Б, Г, Е — динамика активности ГПО и ГР в КГМ ВУ крыс в курсе ГБГ₃₀₀₀ (Б), ГБГ₅₀₀₀ (Г), ГБГ₇₀₀₀ (Е).

По оси абсцисс обозначено количество дней применения однокурсового гипоксического воздействия (1 мин реоксигенации). По оси ординат — % к контролю (100%). Белые столбики — активность ГПО (глутатионпероксидаза); серые столбики — активность ГР (глутатионредуктаза); * — данные отличаются от контроля ($p < 0,05$).

вень GSSG (рис. 1Б) и активность ГПО и ГР оставались сниженными на протяжении всего периода тренировок (рис. 3Б). Уровень ГП постепенно и значимо увеличивался, в отличие от НУ крыс, что свидетельствует о постепенной активации процессов свободнорадикального и перекисного окисления у КГМ ВУ крыс в процессе курсового применения гипоксии (рис. 2Б).

Таким образом, при действии щадящего режима гипоксии (14% O₂) антиоксидантная активность системы глутатиона и ее восстановительная способность у ВУ крыс, начиная с 3-го гипоксического воздействия и до конца гипоксического курса была снижена сравнительно с НУ крысами.

Динамика исследуемых параметров цикла глутатиона в КГМ ВУ крыс в условиях гипоксии средней тяжести (10% O₂, 1 ч) лишь частично была сходна с динамикой при 14% O₂. Количественные изменения измеряемых параметров были выражены сильнее, чем в предыдущем случае. Сразу по окончании гипоксического воздействия снижение содержания GSSG и IOS в раннем постгипоксическом периоде составляло уже 30—35% (рис. 1Г), величина отношения GSH/GSSG увеличивалась на 60%. Значимые изменения содержания ГП и продуктов ПОЛ в 1-е сут отсутствовали (рис. 2Г), однако активность ГПО и ГР снижалась на 25—30% (рис. 3Г).

С увеличением числа гипоксических тренировок происходило постепенное увеличение уровня GSSG, IOS (рис. 1Г) и уменьшение отношения GSH/GSSG. Активность ферментов цикла глутатиона устойчиво снижалась: на 30—40% после 3—8-го воздействий и на 20—25% после 15-го (рис. 3Г); реактивация ГПО и ГР, характерная для щадящей гипоксии, отсутствовала. Параллельно со снижением активности ферментов цикла глутатиона наблюдали увеличение уровня ГП на 20—30% после 8—15-го воздействий (рис. 2Г). При этом значимые изменения содержания продуктов ПОЛ в КГМ ВУ крыс отсутствовали. Таким образом, при данном режиме гипоксического воздействия в КГМ ВУ крыс, в отличие от КГМ НУ животных, происходило ослабление регуляторного влияния системы глутатиона на внутриклеточный редокс-статус.

Еще большие нарушения в работе системы глутатиона в КГМ ВУ животных происходили в условиях тяжелой гипоксии (ГБГ, 8% O₂, 1 ч). Так, сразу же после 1-го гипоксического воздействия происходило не снижение, а некоторое увеличение GSSG на 15% (рис. 1Е), значимое снижение активности ГПО и ГР на 25% и 35% соответственно (рис. 3Е), а также увеличение содержания ГП на 25% (рис. 2Е). Все эти данные свидетельствуют о развитии в КГМ ВУ крыс уже в раннем постгипоксическом периоде окислительного стресса и подавлении регуляторной функции системы глутатиона.

При действии тяжелой гипоксии увеличение уровня GSSG на 25% (рис. 1Е) и снижение отношения GSH/GSSG на 20% регистрировали в период первых трех гипоксических воздействий. Однако при продолжении тренинга их значения становились сходными с базовыми. Активность ГПО оставалась устойчиво сниженной на 25—30%, активность ГР продолжала снижаться с увеличением числа гипоксических воздействий (8% O₂; 1 ч) — на 40—50% после 3—8-го эпизода гипоксии (рис. 3Е). Сравнение фенотипов показало, что на протяжении всего курса тяжелой гипоксии активность ГР в КГМ ВУ крыс была существенно (на 20—30%) ниже в сравнении с НУ. Снижение активности ферментов цикла глутатиона в ходе многократного применения тяжелой гипоксии сопровождалось увеличением содержания ГП и продуктов ПОЛ в КГМ ВУ крыс на 20—40% (рис. 2Е). Таким образом, как однократное, так и курсовое применение тяжелой гипоксии (8% O₂) приводит в КГМ ВУ крыс к существенно более выраженному дисбалансу про- и антиоксидантных систем сравнительно с КГМ НУ крыс.

Проведенное исследование позволяет сделать несколько принципиально новых выводов. Впервые получены данные, свидетельствующие о базовых различиях в работе системы глутатиона КГМ крыс с различной исходной толерантностью к острой гипоксии, проявляющихся в нормоксических условиях. У НУ крыс эта система обеспечивает более эффективную антиоксидантную защиту ткани мозга, что подтверждается достоверно более низким содержанием окисленного глутатиона, гидроперекисных метаболитов и меньшей активностью ферментов цикла глутатиона в сравнении с ВУ.

Выявленные базовые различия в окислительно-восстановительных свойствах ткани КГМ у двух фенотипов животных сохраняются и при гипоксических воздействиях. Полученные в работе данные позволяют говорить о более сбалансированной работе глутатионовой системы КГМ НУ особей, обеспечивающей и в условиях гипоксии лучшую антиоксидантную защиту мозга сравнительно с ВУ. Действительно, и при однократном, и при курсовом применении наиболее щадящего гипоксического режима (14% O₂) срочная реакция системы глутатиона КГМ НУ крыс была направлена на сохранение восстановительного фонда клетки и поддержание низкого уровня свободнорадикальной активности. В КГМ ВУ крыс качественно сходные по направленности изменения в содержании окисленного глутатиона количественно были выражены гораздо меньше, развивались на фоне уменьшения активности ферментов цикла глутатиона и нарастающего увеличения содержания гидроперекисных метаболитов. Таким образом, уже при действии наиболее щадящего режима гипоксии (14% O₂) в КГМ ВУ крыс появля-

лись признаки окислительного стресса. Существенно более выраженные признаки дизрегуляции в системе глутатиона ВУ животных сравнительно с НУ проявлялись и в условиях гипоксии средней тяжести (10,5% O₂) как при однократном, так и при курсовом ее применении. Наконец, в условиях тяжелой гипоксии (8% O₂) регуляторная функция глутатионовой системы была резко снижена в КГМ обоих фенотипов животных, однако степень нарушения регуляторной функции у ВУ крыс была выражена гораздо сильнее.

Таким образом, очевидно, что функциональная активность системы глутатиона зависит как от тяжести и длительности гипоксического воздействия, так и от индивидуальной переносимости гипоксии, т.е. генетически детерминирована. В КГМ НУ крыс эта система сохраняет свои регуляторные свойства в более широком диапазоне сниженных значений рO₂ сравнительно с ВУ животными, а ее дизрегуляция развивается при более тяжелых формах гипоксии либо при более длительном их применении. Все это делает принципиально важным выбор режимов гипоксического воздействия при терапевтическом применении прекоondиционирования. Оптимальными, по-видимому, следует считать такие гипоксические воздействия, которые не сопровождаются появлением признаков окислительного стресса.

Список литературы

1. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 2000; 62: 649-71.
2. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах. *Успехи биологической химии*. 2008; 48: 319-58.
3. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Глутатион ядра клетки и его функции. *Биомедицинская химия*. 2010; 56(6): 657-62.
4. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 295: 849-68.
5. Mansfield K.D., Simon M.C., Keith B. Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 1358-66.
6. Uys J.D., Xiong, Y., Townsend D.M. Nitrosative stress-induced S-glutathionylation of protein disulfide isomerase. *Methods Enzymol*. 2011; 490: 321-32.
7. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. Влияние гипоксического прекоondиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 151(3): 263-8.
8. Кирова Ю.И. Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 3: 51-5.
9. Fan J., Cai H., Yang S., Van L., Tan W. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008; 151(2): 153-8.
10. Honchar O.O., Man'kov's'ka I.M. Glutathione system adaptation to acute stress in the heart of rats during different regimes of hypoxia training. *Ukr Biokhim Zh*. 2007; 79(3): 79-85.
11. Maiti P., Singh S.B., Sharma A.K., Muthuraju S., Banerjee P.K., Pavazhagan G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int*. 2006; 49(8): 709-16.
12. Lin A.M., Chen C.F., Ho L.T. Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. *Exp Neurol*. 2002; 176(2): 328-35.
13. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 1: 2-18.
14. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, и редокс-статус клеток неокортекса крыс на разных стадиях адаптации к гипоксии. *Фізіологічний журнал*. 2013; 59(6): 98-110.
15. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции. *Патогенез*. 2011; 9(3): 4-14.
16. Лукьянова Л.Д., Сукоян Г.В., Кирова Ю.И. О роли провоспалительных факторов, оксида азота и некоторых показателей липидного обмена в формировании срочной адаптации к гипоксии и аккумуляции HIF-1. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 154(11): 550-4.
17. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекоondиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 147(4): 380-4.
18. Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д. Роль индивидуальной резистентности к гипоксическому фактору при поиске антигипоксантов и оценки эффективности их действия. В кн.: Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М; 1989; 160-4.
19. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995; 19(3): 271-80.
20. Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun*. 1989; 6: 67-75.
21. Okawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 1979; (95): 351-8.
22. Eyer P., Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal. Biochem*. 1986; 153: 57-66.
23. Olsvik P.A., Kristensen T., Waagb R., Tollefsen K.-E., Rosseland B.O., Toften H. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology*. 2006; 209: 2893-901.
24. Ozdemir G., Ozden M., Maral H., Kuskay S., Cetinalp P., Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann. Clin. Biochem*. 2005; (42); 99-104.
25. Dringen R., Gutterer J.M. Glutathione reductase from bovine brain. *Methods Enzymol*. 2002; 348: 281-8.
26. Merante F., Altamentova S.M., Mickle D.A.G., Weisel R.D., Thatcher B.J., Martin B.M. et al. The characterizati-

on and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002; 229: 73-83.

27. Abramov A.Y., Scorziello A., Duchon M.R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27(5):1129-38.

28. Gupte S.A., Arshad M., Viola S., Kaminski P.M., Ungvari Z., Rabbani G. et al. Hypoxia promotes relaxation of bovine coronary arteries through lowering cytosolic NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H2228-H2238.

References

1. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 2000; 62: 649-71.

2. Kalinina E.V., Chernov N.N., Saprin A.N. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Uspehi biologicheskoy himii*. 2008; 48: 319-58. (in Russian)

3. Kulinskij V.I., Kolesnichenko L.S. Nuclear glutathione and its functions. *Biomedicinskaja himija*. 2010; 56(6): 657-62. (in Russian)

4. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 295: 849-68.

5. Mansfield K.D., Simon M.C., Keith B. Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 1358-66.

6. Uys J.D., Xiong, Y., Townsend D.M. Nitrosative stress-induced S-glutathionylation of protein disulfide isomerase. *Methods Enzymol*. 2011; 490: 321-32.

7. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I. Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011; 151(3): 292-6.

8. Kirova Yu.I. Effect of hypoxia on the dynamic content of HIF-1 in the cerebral cortex and the formation of adaptation in rats with different resistance to hypoxia. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2012; 3: 51-5. (in Russian)

9. Fan J., Cai H., Yang S., Van L., Tan W. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008; 151(2): 153-8.

10. Honchar O.O., Man'kovs'ka I.M. Glutathione system adaptation to acute stress in the heart of rats during different regimes of hypoxia training. *Ukr Biokhim Zh*. 2007; 79(3): 79-85.

11. Maiti P., Singh S.B., Sharma A.K., Muthuraju S., Banerjee P.K., Ilavazhagan G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int*. 2006; 49(8): 709-16.

12. Lin A.M., Chen C.F., Ho L.T. Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. *Exp Neurol*. 2002; 176(2): 328-35.

13. Lukyanova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signaling mechanisms and their role in the system of regulation. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2011; 1: 2-18. (in Russian)

14. Kirova Yu.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of hypoxia-inducible factor expression, and the redox status of the cells of the neocortex rats at different stages of adaptation to hypoxia. *Fiziologichnij zhurnal*. 2013; 59(6): 98-110. (in Russian)

15. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I., Sukoyan G.V. New findings about signaling mechanisms of adaptation to hypoxia and their role in the systemic regulation. *Patogenez*. 2011; 9(3): 4-14. (in Russian)

16. Lukyanova L.D., Sukoyan G.V., Kirova Yu.I. Role of proinflammatory factors, nitric oxide, and some parameters of lipid metabolism in the development of immediate adaptation to hypoxia and HIF-1 accumulation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 154(5): 597-601.

17. Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kopaladze R.A. Development of resistance of an organism under various conditions of hypoxic preconditioning: role of the hypoxic period and reoxygenation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009; 147(4): 400-4.

18. Chernobaeva G.N., Lukyanova L.D. The role of individual resistance to hypoxic factor when searching antihypoxants and evaluate the effectiveness of their actions. In: *Farmakologicheskaja korekcija gipoksicheskikh sostojanij*; Moscow; 1989; 160-4. (in Russian)

19. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995; 19(3): 271-80.

20. Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun*. 1989; 6: 67-75.

21. Okawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 1979; (95): 351-8.

22. Eyer P., Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal. Biochem*. 1986; 153: 57-66.

23. Olsvik P.A., Kristensen T., Waagb R., Tollefsen K.-E., Rosseland B.O., Toften H. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology*. 2006; 209: 2893-901.

24. Ozdemir G., Ozden M., Maral H., Kuskay S., Cetinalp P., Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann. Clin. Biochem*. 2005; (42); 99-104.

25. Dringen R., Gutterer J.M. Glutathione reductase from bovine brain. *Methods Enzymol*. 2002; 348: 281-8.

26. Merante F., Altamentova S.M., Mickle D.A.G., Weisel R.D., Thatcher B.J., Martin B.M. et al. The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002; 229: 73-83.

27. Abramov A.Y., Scorziello A., Duchon M.R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27(5):1129-38.

28. Gupte S.A., Arshad M., Viola S., Kaminski P.M., Ungvari Z., Rabbani G. et al. Hypoxia promotes relaxation of bovine coronary arteries through lowering cytosolic NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H2228-H2238.

Поступила 29.10.14

Received 19.10.14