

Інтервальні гіпоксичні тренування посилюють захисну антиоксидантну систему міокарду щурів за умов стресорного впливу

У даному дослідженні автори показують, що дозована помірна переривчаста гіпоксія у сеансах інтервальних нормобаричних гіпоксичних тренувань обмежує надмірне посилення вільно-радикальних процесів за рахунок активації власних захисних систем організму, котре здатне запобігти ушкоджуючому впливу екстремального чинника, яким є гострий психоемоційний стрес. Наші дослідження дають підставу розглядати адаптаційні гіпоксичні тренування як один із засобів підготовки осіб, чия професійна діяльність пов'язана з ризиком для життя та психоемоційними навантаженнями.

Незважаючи на численні дослідження, проблема підвищення резистентності організму до дії надзвичайних подразників залишається актуальною. В наш час перспективними є різні види адаптаційних тренувань, до яких відносяться інтервальні нормобаричні гіпоксичні тренування (ІГТ). Вважається, що вплив на організм короткотривалих гіпоксичних стимулів, що чергуються з нормоксичними періодами у процесі ІГТ зіставний з феноменом «гіпоксичного прекодиціонування» [1]. Протекторний ефект даного феномену відмічався рядом авторів у людей та тварин і вважався однією з форм адаптації організму до дії екстремальних факторів – тяжкої гіпоксії, фізичного навантаження, стресу [2-6].

Відомо, що будь яка стресорна реакція супроводжується збільшенням активних форм кисню (АФК). Це зумовлено реакцією адаптації організму до надзвичайних умов, за яких АФК відіграють роль вторинних месенджерів і беруть участь у процесах природної сигнальної трансдукції в тканинах [7]. За вказаних умов, перш за все, відбувається активація факторів транскрипції (HIFs, NF- κ B, Nrf2, AP-1 тощо) і відповідних генів, котрі здатні кодувати ферменти-антиоксиданти, зокрема СОД, ферменти системи глутатіону, каталазу [8]. На сьогодні вважають, що вільно-радикальні процеси можуть займати одну з ключових позицій в регуляторних механізмах, які визначають можливість виживання клітини, її загибель або трансформацію у стресорних ситуаціях [7,8].

Стан, при якому внаслідок дії будь-яких чинників генерація вільно-радикальних процесів зростає більше, ніж потужність антиоксидантної системи (АОС), дослідники визначають як оксидативний стрес [9]. При дії стресора достатньої сили оксидативний стрес виступає як серйозна небезпека для функціонування організму, тому в усіх клітинних компонентах існує складна багаторівнева система захисту від надмірного утворення продуктів вільно-радикальних перетворень. Ланка антиоксидантних реакцій у механізмі захисних процесів є провідною і найбільш потужною, оскільки вона не тільки запобігає розвитку вільно радикальних реакцій, нагромадженню супероксид-

аніонів, перекисів, але й підтримує високу активність окисно-відновних процесів, забезпечує елімінацію кінцевих кисневих метаболітів із залученням їх в енергетичний обмін, сприяє активації процесів синтезу, у тому числі ферментів супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, які відповідно формують перший та другий ступені захисту [10,11].

Метою дослідження стало вивчення про- та антиоксидантного балансу у міокарді щурів за умов дії гострого стресу після застосування інтервальних нормобаричних гіпоксичних тренувань.

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 200-220г, які були розділені на групи (по 6 у кожній). 1- контроль (К). Цю групу складали тварини, які знаходились у звичайних нормоксичних умовах; 2- тварини, які піддавались дії гострого іммобілізаційного стресу (ІС), який вважається порушує психоемоційний стан. Щурів іммобілізували у пластикових пеналах з жорсткою фіксацією протягом 6 годин; 3- тварини, які піддавались дії переривчастої гіпоксії (ІГТ). Щури дихали гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 12%O₂ в азоті протягом 5 хв з 15 хвилинними нормоксичними інтервалами (реоксигенація). Чергування періодів гіпоксії/реоксигенація тривали 65 хв кожен день протягом 3 тижнів; 4- тварини, які піддавались дії 6- годинного іммобілізаційного стресу на першу добу після 3 тижневих гіпоксичних тренувань (ІГТ+ІС). Сеанси інтервальних гіпоксичних тренувань відбувались у герметичних нормобаричних камерах, де підтримувалась постійна кімнатна температура. З метою поглинання виділеного тваринами вуглекислого газу і водяних парів у камерах використовували адсорбент. Ефективність стресу контролювали за змінами маси надниркової залози і тімуса щурів, а також концентрації кортикостерону у плазмі крові. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом відразу після експерименту. Гомогенати з тканин міокарда готували на 0.025М Трис-буфері, що містив 0.175М KCl та 1мМ EDTA (pH 7.8; 1:9) з наступним центрифугуванням (15 000g 20хв). В роботу брали постмітохондріальну фракцію супернатанта. Інтенсивність прооксидантних процесів досліджували за змінами у кількості вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Для цього вивчали вміст продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою - ТБК-активні продукти (ТБК-АП). Стан антиоксидантної системи досліджували за змінами у активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази та каталази. Стан глутатіонової системи вивчали за вмістом відновленого глутатіону та активності глутатіон редуктази і глутатіон пероксидази. Результати досліджень обробляли статистично за допомогою програми “Origine, 7.0”. Вірогідність розходжень між групами порівняння була визначена методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test).

При використанні в сеансах ІГТ гіпоксичної складової помірної сили (дихання газовою сумішшю з 12% O₂) в клітинах міокарду відмічалася лише тенденція до підвищення вмісту вторинних продуктів ПОЛ. Активність антиоксидантних, а також GSH-залежних ферментів залишалась у межах контролю. При цьому, рівень GSH в тканинах серця мав тенденцію до підвищення (рис.1 та 2). Відомо, що збереженню глутатіонового пулу за умов

гіпоксичного тренування сприяє узгоджена дія в глутатіоновому редокс-циклі ГП з ГР, яка регенерує GSH з його окисленої форми і, таким чином, забезпечує збереження відновленого потенціалу глутатіону [12, 13].

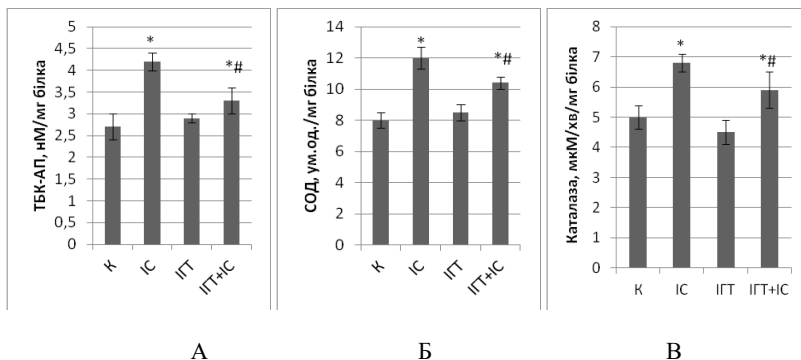


Рисунок 1. Вміст ТБК-АП (А), активність СОД (Б) та каталази (В) у міокарді щурів за умов застосування інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ) та іммобілізаційного стресу (ІС). * $P < 0,05$ - відносно контролю; # $P < 0,05$ -відносно іммобілізаційного стресу (ІС).

6-ти годинна іммобілізація призводила до інволюції надниркової залози і тімуса у щурів, а також зростанню концентрації кортикостерону у плазмі крові в 4 рази на відміну від контролю ($P < 0,05$), що свідчать про розвиток стрес- реакції у цих тварин. Як показали результати досліджень, гострий стрес впливав як на стан ферментної, так і неферментної частини антиоксидантного захисту міокарда: зростала активність СОД і каталази (на 50 та 36%, $P < 0,05$), в той час як активність ГП і ГР знижувалася (рис.1 та 2), що свідчить про дисбаланс у антиоксидантній системі. Висока спорідненість анти радикального ферменту СОД і антипероксидного ферменту каталази до супероксид аніон- радикалу і H_2O_2 , відповідно, і значна доступність цих субстратів за умов окисдації, ймовірно, і обумовили ріст активності цих ферментів у порівнянні з контролем. Значне зниження вмісту GSH (на 28 %, $P < 0,05$), а також активності глутатіон-залежних ферментів ГР та ГП (на 24 та 25%, відповідно) за умов стресу у порівнянні з контролем ($P < 0,05$) додатково підтверджує наявність оксидативного стресу у міокарді щурів. Ці зміни відбувалися на фоні зростання ПОЛ у серці. Так, концентрація ТБК-АП зростала на 56% ($P < 0,05$) у порівнянні з контролем (рис. 1А). Значні зміни у про- та антиоксидантному балансі тканин щурів за умов дії різних стресорних чинників також відмічалися рядом інших авторів і були характерні як для міокарду, так і інших тканин - печінки, легень, скелетних м'язів тощо[2, 3, 5,13,14].

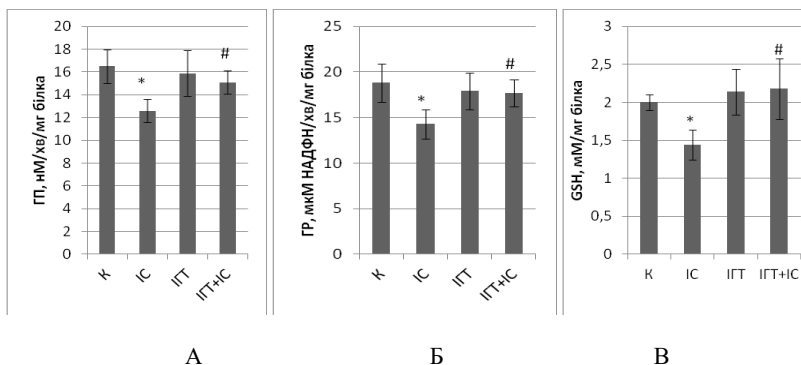


Рисунок 2. Активність ферментів глутатіон пероксидази (ГП) (А), глутатіон редуктази (ГР) (Б) та вміст відновленого глутатіону (GSH) (В) у міокарді щурів за умов застосування інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ) та іммобілізаційного стресу (ІС). * $P<0,05$ - відносно контролю; # $P<0,05$ -відносно іммобілізаційного стресу (ІС).

При дії надзвичайного подразника у тварин, адаптованих до гіпоксії в процесі довготривалих помірної сили сеансів ІГТ, відмічалось зниження вмісту вторинних продуктів ПОЛ на 22% ($P<0,05$), зниження гіперактивації СОД і каталази, а також підвищення кількості GSH та активності ГП (на 51 та 20%, відповідно) відносно таких показників у щурів 2-ї групи ($P<0,05$) (рис.1 та 2). Відомо, що поповнення внутрішньоклітинного пулу GSH залежить від швидкості відновлення утворюваного окисненого глутатіону, яке здійснюється у глутатіонредуктазних реакціях [12,13]. Ріст активності ГР (на 24%, $P<0,05$) у тварин 4-ї групи у порівнянні з 2-ю групою, ймовірно, був обумовлений достатньою кількістю внутрішньоклітинних запасів НАДФН, які забезпечують підтримку глутатіону у відновленому стані і тим самим впливають на стан глутатіонового редокс-циклу [15]. Про ефективність процесів адаптації свідчить той факт, що у плазмі крові тварин 4-ї групи рівень стрес-гормону кортикостерону знизився на 28% у порівнянні з тваринами 2-ї групи ($P<0,05$).

Отримані результати узгоджуються з думкою ряда авторів відносно позитивних ефектів адаптації до гіпоксичної гіпоксії при дії стресорних факторів [2,5,16,17], однак механізми такого ефекту ще знаходяться на стадії дослідження. Вважається, що циклічні переходи гіпоксія – реоксигенація свій стимулюючий вплив на обмінні процеси в основному реалізують через активацію вільнорадикальних процесів, які ініціюються надлишком донорів електронів відновлених еквівалентів, що накопичуються при гіпоксії та, в результаті зростання кисню як акцептора електронів, при оксигенації [7]. АФК виконують роль тригера, який здатен запускати каскад внутрішньоклітинної сигналізації з наступною активацією редокс-чутливих факторів транскрипції та генів, що в свою чергу призводить до синтезу захисних білків, серед яких антиоксидантні ферменти займають вагомe місце

[18,19]. Багаторазова низькоінтенсивна індукція АФК за умов ІТ викликає підвищення резистентності клітин до дії стресорного чинника і сприяє довгостроковій адаптації [7,18].

Висновки. Таким чином, довготривала періодична помірна гіпоксія у сеансах ІТ знижувала інтенсивність процесів ПОЛ та підвищувала стійкість ендогенної антиоксидантної системи міокарду до стресорних впливів. Отримані дані, а також результати наших попередніх досліджень дають підставу рекомендувати використання даного режиму ІТ в практиці підготовки спеціалістів у якості адаптогену, що підвищує стійкість організму до кисневої недостатності та стресорної напруги.

Список літератури

1. Колчинская А.З., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. М.: Наука. 2003. 408с.
2. Gonchar O. Effect of intermittent hypoxia different regimes on mitochondrial lipid peroxidation and glutathione-redox balance in stressed rats. *Cent Europ J Biol*. 2008; 3: 233-242.
3. Gonchar O., Mankovska I. Hypoxia/reoxygenation modulates oxidative stress level and antioxidative potential in lung mitochondria: possible participation of p53 and NF- κ B target proteins. *Arch Pulmonol Respir Care*. 2017; 3(2): 35-43.
4. Quintero M., Gonzalez-Martin M., Vega-Agapito V., Gonzalez C., Obeso A, Farré R., Agapito T., Yubero S. The effects of intermittent hypoxia on redox status, NF- κ B activation, and plasma lipid levels are dependent on the lowest oxygen saturation. *Free Radic Biol Med*. 2013; 65:1143–1154.
5. Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM, Zhou ZN. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Research*. 2003; 13: 385–391.
6. Gonchar O., Mankovska I. Activity and Expression of the Antioxidant Enzyme MnSOD in the Mitochondria during Prolonged Hypoxia/hyperoxia Exposure. *Int J Biol Chem*. 2011; 5: 342-351.
7. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282: C227-C241.
8. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther*. 2010; 125:376–393.
9. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015; 4 : 180–183.
10. Limon-Pacheco J., Gonsebatt M. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*. 2009; 674:137-147.
11. Gonchar O., Mankovskaya I. Antioxidant system in adaptation to intermittent hypoxia. *J Biol Sci*. 2010; 10 (6):545-554.
12. Gonchar O., Maznychenko A., Klyuchko O., Mankovska I., Butowska K., Borowik A., Piosik J. C60 Fullerene Reduces 3-Nitropropionic Acid-Induced Oxidative Stress Disorders and Mitochondrial Dysfunction in Rats by Modulation of

p53, Bcl-2 and Nrf2 Targeted Proteins. *Int J Mol Sci.* 2021, 22, 5444. <https://doi.org/10.3390/ijms22115444>

13. Gonchar O., Maznychenko A., Bulgakova N., Vereshchaka V. Tomiak T., Ritter U., Prylutsky Y., Mankovska I., Kostyukov A. C60 Fullerene Prevents Restraint Stress-Induced Oxidative Disorders in Rat Tissues: Possible Involvement of the Nrf2/ARE-Antioxidant Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2018, 2018, 2518676

14. Gonchar O.A., I.N.Mankovska. Time-dependent effect of severe hypoxia/reoxygenation on oxidative stress level, antioxidant capacity and p53 accumulation in heart mitochondria. *Ukr Biochem J.* 2017; 89(6): 41-49.

15. Lee S. M., Koh H. J., Park D. C. et al. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 1185-1196.

16. Gonchar O., Mankovskaya I. Effect of moderate hypoxia/reoxygenation on mitochondrial adaptation to acute severe hypoxia. *Acta Biologica Hungarica.* 2009; 60(2): 185–194.

17. Gonchar O. Effect of intermittent hypoxia on pro- and antioxidant balance in rat heart during high-intensity chronic exercise. *Acta Physiol Hung.* 2005; 92: 211-220.

18. Wenger R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002; 16:1151-1162.

19. Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 2009; 77: 1303-1315.