УДК 591.139+577.1.576.311.347.577.352.4:616-092.4.577.218

Г.Л. Вавілова, Т.В. Серебровська, О.В. Рудик, М.В. Бєлікова, Є.Е. Колєснікова, Т.В. Кукоба, В.Ф. Сагач

Вплив гіпоксичних тренувань на чутливість феніларсиноксидіндукованого відкриття мітохондріальної пори в серці щурів

На митохондриях, изолированных из ткани сердца взрослых крыс, в условиях влияния на них двух режимов нормобарической интервальной гипоксической тренировки (ИГТ): более мягкого, но продолжительного (15-минутное дыхание газовой смесью с 11%-м содержанием кислорода в азоте, режим 1) и более жесткого, но кратковременного (5-минутное дыхание с 8%-м содержанием кислорода в азоте, режим 2) изучали чувствительность фениларсиноксид (ФАО)-индуцируемого открытия митохондриальной поры (МП) по изменению набухания митохондрий, регистрируемого спектрофотометрически при длине волны 520 нм. Показано, что ИГТ в режиме 1 существенно не влияли на ФАО-индуцируемое циклоспорин А-чувствительное набухание митохондрий, а также на показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ферментов антиоксидантной защиты. Так, наблюдалась лишь тенденция к снижению концентрации малонового диальдегида (МДА) в крови и в печени (в среднем на 20 %). Активность супероксиддисмутазы (СОД) незначительно увеличивалась, а каталазы (КАТ), напротив, уменьшалась. Установлено, что ИГТ в режиме 2 оказывали положительный корригирующий эффект в отношении ФАО-индуцируемого открытия МП в сердце взрослых крыс, причем защитное действие более жесткого режима гипоксии сохранялось даже через 45 сут после прекращения ИГТ. Необходимо отметить, что указанный режим тренировок вызывал интенсификацию процессов ПОЛ, что выражалось в значительном повышении содержания МДА (как в крови, так и в печени) и активности СОД при одновременном уменьшении активности КАТ. Делается заключение, что ИГТ в режиме 2 повышают чувствительность митохондриальной мембраны к индуктору открытия МП – ФАО.

ВСТУП

Тренування організму короткочасними нормобаричними періодичними гіпоксичними стимулами, які за своєю дією можна прирівняти до гіпоксичного прекондиціонування, супроводжуються насамперед зниженням вмісту кисню в тканинах і чергуються з періодами нормоксії. Вважається, що саме під час останніх – включаються кардіопротекторні механізми, дія яких подібна до ефекту ішемічного прекондиціонування. Оскільки молекулярні механізми обох типів описаних явищ ще не зовсім досліджено, вивчення дії зокрема гіпоксичного прекондиціонування як in vitro, так і in vivo є актуальним.

Мітохондрії – одночасно і сенсори, і регулятори змін кисневого стану організму. Крім того, вони забезпечують клітинний енергетичний метаболізм, і їм належать ключові позиції в процесі апоптозу – запрограмованій загибелі клітин. Мітохондрії є головним джерелом вільних радикалів і водночас мішенню їх ушкоджувальної дії. Відкриття так званої мітохондріальної пори (МП) у внутрішній мітохондріальній мембрані, що призводить до набухання матриксу, руйнування зовнішньої мембрани мітохондрій, вивільнення з

© Г.Л. Вавілова, Т.В. Серебровська, О.В. Рудик, М.В. Бєлікова, Є.Е. Колєснікова, Т.В. Кукоба, В.Ф. Сагач

міжмембранного простору таких апоптотичних сигнальних молекул, як цитохром *c*, Ca^{2+}, фактор, що індукується апоптозом, вважається критичним моментом в розвитку деяких патологічних станів організму і, насамперед, постішемічних реперфузійних ушкоджень серця [13, 16, 32]. Дані літератури останніх років свідчать про те, що одним із специфічних тригерів відкриття МП є вільні радикали [20, 28]. Так, супероксидний радикал може викликати набухання мітохондрій і вивільнення низькомолекулярних речовин (молекулярна маса менша ніж 1500 Да), що включаються в постмітохондріальні метаболічні процеси, навіть за відсутності деполяризації мітохондріальної мембрани [13, 15, 16].

Гіпоксія є одним із універсальних модуляторів енергетичних процесів за фізіологічних умов і важливою причиною порушень метаболізму і функцій клітини при багатьох патологічних станах організму. Дефіцит енергії, що створюється за певних умов в мітохондріях, активує вільнорадикальне окиснення в клітині [26, 27].

У наших попередніх дослідженнях було показано позитивну дію інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ) на стан вільнорадикальних процесів у людей і тварин [3, 6]. Проте в цих дослідженнях було використано тільки один, більш м'який, режим ІГТ. Разом з тим фактор часу та інтенсивність подразнення гіпоксичним стимулом можуть відігравати головну роль у зміні інтенсивності вільнорадикальних процесів. Згідно з деякими даними [12], можна відзначити два рівня генерації активних форм кисню (АФК): раннє невелике збільшення та більш пізнє їхнє посилення, пов'язане з виснаженням вмісту відновленого глутатіону і колапсом мітохондріального мембранного потенціалу. Є відомості про те, що екзогенні вільні радикали також викликають відкриття МП, яке блокується за допомогою класичного інгібітора МП – циклоспорину А. Результати експериментів свідчать, що пізня продукція радикалів асоціюється з підвищенням чутливості відкриття МП [20]. Одним із індукторів відкриття МП може бути феніларсиноксид (ФАО) – модифікатор сульфгідрильних груп, який використовують для моделювання in vitro умов оксидативного стресу.

Мета нашої роботи – дослідити ФАО-індуковане відкриття МП у серці щурів, а також інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), активність антиоксидантних ферментів при адаптації до двох, м'якого та жорсткого, режимів ІГТ і перевірити їх післядію на вищезгадані показники через 45 діб.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 24 дорослих щурах-самцях лінії Вістар масою 200–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Перед дослідами тварин поділили на чотири групи по шість тварин у кожній. Першу (контрольну) групу склали інтактні тварини, яких кожного дня привчали до перебування в камері для ІГТ, але без подачі гіпоксичної газової суміші, і забивали одночасно з кожною дослідною групою. Тварин II, III і IV груп використовували у дослідах після курсу 14-добових ІГТ у різних режимах.

Для щурів II групи використовували режим 1: щоденне перебування тварин в герметичній нормобаричній камері, яку впродовж 15-хвилиних інтервалів вентилювали гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 11 % кисню в азоті, що чергувалися з 15-хвилинними інтервалами вентиляції кімнатним повітрям. Такі цикли повторювали п'ять разів на день протягом 14 діб. З метою поглинання виділеного тваринами вуглекислого газу і водяних парів у камері використовували адсорбент. Для тварин III та IV груп застосовували сеанси більш жорсткої, але менш тривалої гіпоксії (режим 2): 5-хвилинні інтервали вентиляції газовою сумішшю, що містила 8 % кисню в азоті, котрі чергувалися з 15-хвилинними інтервалами вентиляції кімнатним повітрям; цик-

ли повторювали п'ять разів на день протягом 14 діб.

Тварин I–III груп декапітували під ефірним наркозом на наступну добу після 14-добового курсу дійсного або імітованого ІГТ. З метою дослідити віддалені ефекти ІГТ тварин IV групи забивали через 45 діб після 14-добового курсу ІГТ.

Виділення мітохондрій із серця щурів. Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl (4°C). Мітохондрії виділяли за описаним нами методом [7] і в суспензії визначали вміст білка за Лоурі .

Дослідження відкриття МП. Відкриття МП реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 520 нм за зниженням оптичної густини (D) ізольованих мітохондрій протягом 20 хв в інкубаційному середовищі ізотонічного складу після їх набухання за умов дії ФАО, який є модифікатором сульфгідрильних груп. Для цього мітохондрії інкубували в 3 мл середовища наступного складу (ммоль/л): тріс-HCl – 25 (pH 7,4, при 23°C), KCl – 120, KH_2PO_4 – 3, сукцинат натрію – 5. Концентрація білка становила 0,5 мг/мл. Контролем була суспензія мітохондрій в інкубаційному середовищі без наявності індуктора з подальшою реєстрацією їх оптичної густини. Для підтвердження того, що зменшення оптичної густини мітохондрій внаслідок їх набухання відбувається через відкриття МП, перед додаванням до мітохондрій індуктора їх додатково інкубували з класичним інгібітором – циклоспорином А (10^{-5} моль/л) протягом 5 хв.

У дослідах з вивчення ФАО-індукованого відкриття МП у серці щурів індуктор використовували в концентраціях 10^{-5} та 10^{-4} моль/л, оскільки за нашими попередніми даними саме за цих умов спостерігали максимальне набухання мітохондрій та вивільнення мітохондріального фактора з серця дорослих щурів [7, 8].

Дослідження інтенсивності ПОЛ і визначення активності ферментів антиоксидантного захисту. Концентрацію продуктів ПОЛ у сироватці крові та їх вміст у гомогенаті печінки визначали за тестом з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [18]. Активність супероксиддисмутази (СОД) у гемолізаті еритроцитів і печінці визначали за ступенем інгібування відновлення нітросинього тетразолію супероксидом, який утворюється в результаті взаємодії феназинеметасульфату та нікотинаміддинуклеотиду, за допомогою спектрофотометричного методу [22], модифікованого Чеварі та співавт. [9]. Активність каталази (КАТ) визначали за ступенем інгібування відновленого молібдата перекисом водню з утворенням стійкого забарвленого комплексу [2].

Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій t Стьюдента, за допомогою програми Origin 6.0 фірми «Microcall Inc.» (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлено типові криві ФАО-індукованого набухання мітохондрій серця дорослих щурів (контроль, I група). Додавання в інкубаційне середовище ФАО в концентрації 10^{-5} або 10^{-4} моль/л призводить до вірогідного зниження у порівнянні з контролем оптичної густини ізольованих мітохондрій за результатами на 20-ту хвилину (в середньому на $\Delta\%=17$, $P< 0,05$; $\Delta\%$ – це величина, що показує різницю у відсотках між 1-ю і 20-ю хвилинами набухання мітохондрій). Класичний інгібітор відкриття МП циклоспорин А в концентрації 10^{-5} моль/л попереджує ФАО-індуковане набухання мітохондрій, що свідчить про пряму причетність набухання до відкриття пори.

За умов тренування щурів у режимі 1 (II група) не було виявлено достовірних змін щодо ФАО-індукованого відкриття МП порівняно з контролем: величина набухання мітохондрій серця за умов дії вищезгаданого індуктора в концентрації 10^{-5} моль/л суттєво не змінювалась і була подібною до такої у щурів контрольної групи (див. рис. 1).

Умови тренування в режимі 2 (III група)

спричиняли зменшення майже вдвічі величини набухання мітохондрій при дії ФАО (10^{-5} моль/л) порівняно з контролем ($\Delta\%=10$, $P<0,05$; рис. 2,а). І навіть через 45 діб після ІГТ (IV група) цей показник знаходився на рівні контролю, тобто мітохондрії були менш чутливими до дії індуктора ФАО (рис. 2,б). Преінкубація мітохондрій з циклоспорином А попереджувала ФАО-індуковане їх набухання, що дає змогу стверджувати, що це відбувається саме через відкриття МП. Той факт, що після ІГТ у режимі 2 спостерігали майже однаковий ступінь набухання мітохондрій серця при дії ФАО в концентрації 10^{-5} та 10^{-4} моль/л, може свідчити про зменшення чутливості до цього індуктора відкриття МП. Існують дані про те, що гіпоксичне прекондиціонування збільшує час, необхідний для відкриття МП, удвічі, що напряму пов'язано із захистом міокарда від ішемічно-реперфузійного пошкодження у відповідь на оксидативний стрес за допомогою зменшення ймовірності відкриття МП [17]. На думку інших авторів, уповільнене відкриття МП може відігравати головну роль в ішемічному прекондиціонуванні [10]. Слід зазначити, що прекондиціонування короткими впливами навіть індуктора відкриття МП – кальцію – інгібує відкриття МП і розвиток апоптозу в серці [31]. Існують ще й інші пояснення щодо захисних механізмів ІГТ на серце. Так показано, що в протекторний вплив гострої інтервальної гіпоксії на постреперфузійні ішемічні ушкодження серця роблять свій внесок оксид азоту та мітохондріальні АТФ-залежні калієві канали [11].

Окремої уваги заслуговують експериментальні дані відносно незначного набухання мітохондрій, ізольованих із серця дорослих щурів, до та після ІГТ у режимі 2 без наявності індуктора ФАО в інкубаційному середовищі (рис. 3). У контрольній групі в умовах зберігання мітохондрій в інкубаційному середовищі завжди спостерігається незначне їх набухання ($\Delta\%=5$, $P<0,05$). Однак після 14-добових ІГТ у режимі 2 (див. рис. 2,а) величина набухання мітохондрій за відсутності ФАО значно збільшується ($\Delta\%=8$, $P<0,05$). Подібне ми спостерігали раніше при вивченні відкриття МП у серці старих щурів [8]. Очевидно, таке набухання мітохондрій відбувається внаслідок посилення окисних процесів, які сприяють підвищенню проникності мітохондріальних мембран і пороутворенню в них. За відсутності ФАО, величина набу-

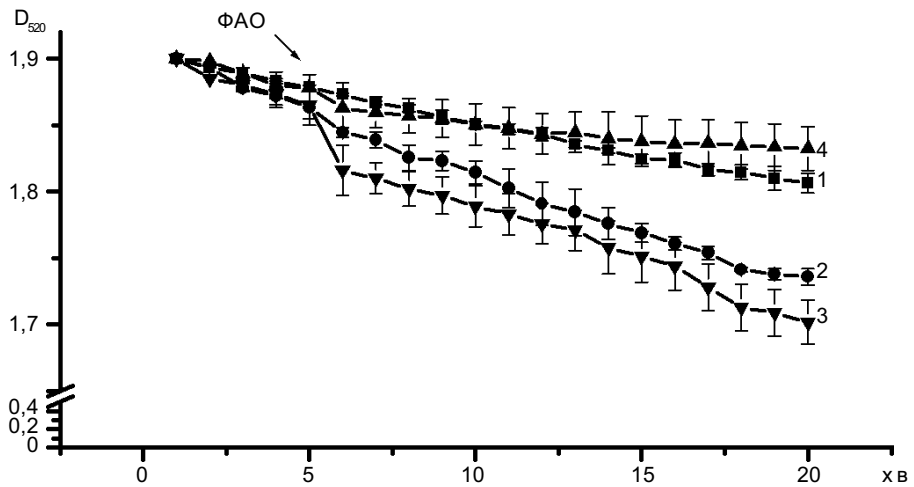

Рис. 1. Набухання мітохондрій, ізольованих із серця дорослих щурів: 1 – контроль (без дії феніларсиноксиду); 2 – дія феніларсиноксиду (10^{-5} моль/л); 3 – дія феніларсиноксиду (10^{-4} моль/л); 4 – преінкубація з циклоспорином А (10^{-5} моль/л), дія феніларсиноксиду (10^{-5} моль/л)

хання мітохондрій через 45 діб після ІГТ (режим 2) зменшується і наближається до значень контрольної групи (див. рис. 3; Δ%= 4,5; P<0,05). Таким чином, нами виявлено позитивний коригуючий ефект 14-добових ІГТ у жорсткому режимі щодо ФАО-індукованого відкриття МП у серці дорослих щурів. Причому цей ефект зберігається протягом 45 діб після ІГТ.

Результати дослідження біохімічних показників вільнорадикального окиснення й активності антиоксидантних ферментів представлено в таблиці. ІГТ у режимі 1 призводили до деякого зниження інтенсивності ПОЛ у стані спокою, а саме спостерігалася тенденція до зниження концентрації МДА в крові та вірогідне зменшення її на 20 % у печінці. При цьому спостерігалося вірогідне підвищення активності СОД у крові та печінці на 29 та 23 % відповідно, та зменшення активності КАТ, що особливо виразно спостерігається в печінці. На відміну від цього, тренування більш жорсткою гіпоксією спричиняло значне підвищення концентрації МДА як в крові (на 67 %), так і в печінці (на 32 %). Крім того, спостерігали більш виражене підвищення активності СОД у крові та печінці на 49 та 32 % відповідно, та зменшення активності КАТ – на 18 та 43 % відповідно. Підвищена концентрація МДА зберігалась навіть через 45 діб після припинення ІГТ і становила 50 % в крові та 29 % в печінці. Несподівані результати одержані щодо активності СОД: через 45 діб після припинення ІГТ спостерігалось її трикратне підвищення як у крові,

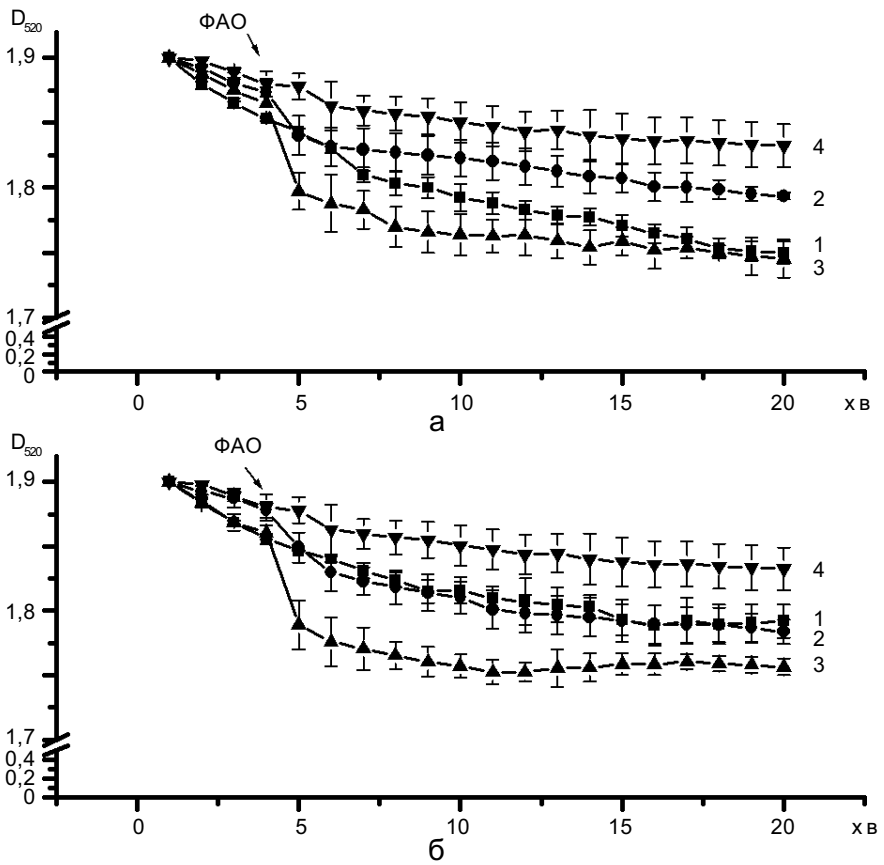

Рис. 2. Набухання мітохондрій, ізольованих із серця дорослих щурів зразу (а) та через 45 діб (б) після інтервальних гіпоксичних тренувань, режим 2: 1 – контроль (без дії феніларсиноксиду); 2 – дія феніларсиноксиду (10^{-5} моль/л); 3 – дія феніларсиноксиду (10^{-4} моль/л); 4 – преінкубація з циклоспорином А (10^{-5} моль/л), дія феніларсиноксиду (10^{-5} моль/л)

Вільнорадикальне окиснення й активність антиоксидантних ферментів у крові та печінці щурів при різних режимах гіпоксичного тренування

Показник	Інтервальні гіпоксичні тренування			
	Контроль	Режим 1	Режим 2	
			через 1 добу	через 45 діб
Малоновий діальдегід				
у крові, мкмоль/л	1,43 ± 0,04	1,24±0, 29	2,39 ± 0,34** (+67 %)	2,15 ± 0,51** (+50 %)
у печінці, мкмоль/г	15,2 ± 0,43	12,2±1,28* (-20 %)	20,05 ± 1,6* (+32 %)	19,6± 2,07* (+29 %)
Супероксиддисмутаза,ум.од./мг				
у крові	2,5 ± 0,27	3,23±0,22* (+29 %)	3,73 ± 0,22* (+49 %)	10,24± 2,68** (+309 %)
у печінці	3,57 ± 0,14	4,38±0,47* (+23 %)	4,84 ±0,64* (+36 %)	16,77 ± 3,77** (+370 %)
Каталаза, ммоль . хв-1 . г білка				
у крові	46,04 ± 3,5	43,36±5,42	37,69 ±2,5* (-18 %)	40,01 ±6,16
у печінці	70,3 ± 1,44	55,5±1,37* (-21 %)	40,19 ± 3,65** (-43 %)	48,65 ± 9,6** (-31 %)

Примітка: зміни вірогідні щодо контролю: * P<0,05; ** P<0,01. У дужках – значення у відсотках.

так і печінці. Разом з тим активність КАТ у крові сягала контрольного рівня і залишалася зниженою на 31 % у печінці. Відносно значного (в 3 рази) підвищення активності СОД може бути декілька пояснень. З одного боку, ІГТ можуть збільшувати експресію генів ферменту, а з другого – підвищення вмісту субстрату, супероксидного радикала, що також може значно активувати цей фермент. Незважаючи на те, що механізми гіпоксичного та ішемічного прекондиціонування постійно досліджуються на різних органах як in vitro, так in vivo, прийнято вважати, що обидва типи корекцій супроводжуються синтезом нових РНК і білків [30]. Таким чином, результати досліджень свідчать, що більш жорсткий режим тренування гіпоксією викликав ін-

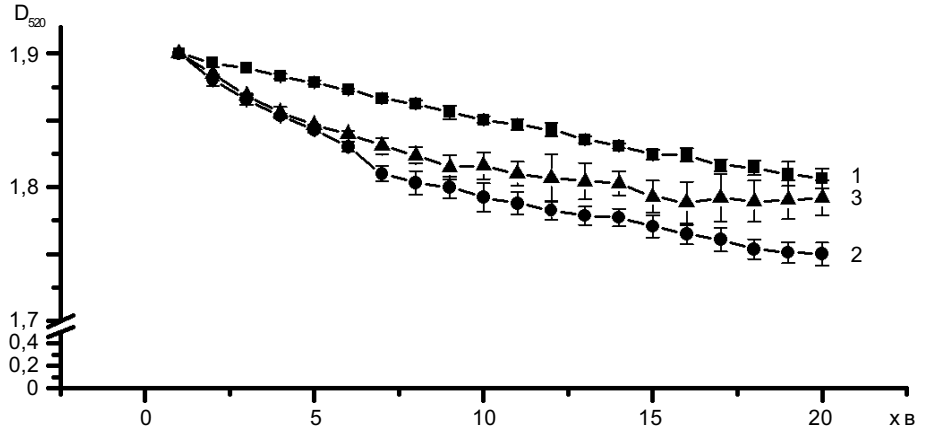

Рис. 3. Набухання мітохондрій, ізольованих із серця дорослих щурів до і після інтервальних гіпоксичних тренувань, режим 2, за відсутності дії феніларсиноксиду: 1 – контроль; 2 – дорослі щурі після інтервальних гіпоксичних тренувань, режим 2; 3 – дорослі щури через 45 діб після інтервалних гіпоксичних тренувань, режим 2

тенсифікацію процесів вільнорадикального окиснення та більш виражене підвищення активності СОД з одночасним зниженням активності КАТ у порівнянні з ІГТ у режимі 1.

Щодо інтенсивності вільнорадикальних процесів у серці при ІГТ показано, що гіпоксія підвищує накопичення супероксидного радикала, що ініціює захисний ефект за допомогою прекондиціонування. Акцентується на тому, що дисмутація до перекису водню, яка відбувається в цитозолі, може бути важливим кроком до індукції оксидантів за умов гіпоксичного прекондиціонування [29]. Раніше нами було показано, що після ІГТ підвищується вміст супероксидного радикала в серці старих щурів порівняно зі старими нетренованими тваринами. Одночасно спостерігається зниження вмісту перекису водню і гідроксильного радикала, а також коригуюча стосовно ФАО-індукованого відкриття МП у серці старих щурів після дій ІГТ [8]. Результати, отримані нами в цій роботі, вказують на підвищення інтенсивності вільнорадикальних процесів у крові та печінці. ІГТ не лише призводять до накопичення продукції АФК, але й викликають пов'язану з цим зміну функціональної активності ферментної антиоксидантної системи [1]. Доведено, що дозовані періодичні гипоксичні подразнення позитивно впливають на процеси антиоксидантного захисту і запобігають руйнівній дії вільних радикалів при епізодах гострої гіпоксії [4, 5, 6].

Останніми дослідженнями показано, що такі антиоксиданти, як СОД, КАТ, аскорбат або рутин попереджують втрату життєздатності клітин, спричинену дією токсичних речовин на МП [23]. Проте існують дані, що КАТ не зменшує посилення мітохондріальної проникності, зумовленої дією хлоргексидину [21]. Є і інші відомості щодо КАТ, які підкреслюють неоднозначність реакцій з боку цього ферменту. Так, описано [14], що функціонування КАТ не сприяло зменшенню набухання мітохондрій, спричиненого дією іонів Са. Інші автори [19] вказують на те, що цей фермент in vitro попереджав їх набухання, зумовлене додаванням неорганічного фосфату або арсенату.

При інтерпретації цих результатів можна припустити, що зменшення активності КАТ при дії ІГТ у режимі 2 на фоні підвищення активності СОД відбувається найімовірніше внаслідок зменшення кількості доступного для КАТ субстрату.

Зіставлення отриманих нами результатів щодо зміни проникності мембран мітохондрій як за наявності, так і за відсутності індуктора ФАО зі змінами показників вільнорадикальних процесів у результаті ІГТ у режимах 1 і 2 певною мірою свідчить про узгодженість цих процесів. Періодичні гіпоксичні стимули змінюють одночасно стан мітохондріальної мембрани клітин серця і антиоксидантної системи, причому протекторний ефект ІГТ залежить від дози гіпоксичного подразнення, а саме від вмісту кисню в гіпоксичній суміші. В наших дослідженнях більш м'який режим гіпоксичного впливу, при якому процеси перекисного окиснення незначною мірою гальмуються, істотно не впливає на набухання мітохондрій, тоді як при дії більш жорсткого режиму гіпоксії, коли спостерігається виражене збільшення продукції вільних радикалів на фоні значного підвищення активності СОД, спостерігається підвищення стійкості мітохондріальної мембрани до ФАО-індукованого відкриття МП, причому захисний ефект дії ІГТ зберігається через 45 діб після закінчення курсу тренувань. Наші результати узгоджуються з даними інших авторів, які наголошують, що протекторний ефект при застосуванні гіпоксичного прекондиціонування залежить від вмісту кисню 8–9 % в гіпоксичній суміші [25]. У наших дослідженнях з вивчення ФАО-індукованого відкриття МП у серці дорослих щурів за умов жорсткого режиму ІГТ з вмістом кисню 8 % спостерігалося зниження чутливості мітохондрій серця до дії індуктора ФАО.

Слід зазначити, що в оцінці впливів різних режимів ІГТ існує принципова відмінність дії інтервальної гіпоксії від хронічної. Вона полягає в тому, що при ІГТ після кожного сеансу гіпоксії існують періоди реоксигенації, котрі супроводжуються активацією процесів ПОЛ. Це призводить до формування в організмі захисних механізмів, які запобігають подальшій активації вільнорадикальних процесів. Тобто у разі використання більш жорсткої гіпоксії інтервальні тренування вираженіше стимулюють активність ферментів антиоксидантного захисту. Існують дані про те, що ІГТ є більш впливовими й інерційними та спричиняють довготривалу системну активацію на відміну від хронічної гіпоксії [24].

Можливо, що посилене утворення вільних радикалів в експериментах з використанням режиму 2 ІГТ призводить до накопичення продуктів ПОЛ і є тригерним механізмом запуску каскаду сигнальної трансдукції, що в свою чергу призводить до підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту. Отже, нами показано, що жорсткий режим гіпоксичних тренувань – більш впливовий фактор підвищення стійкості мітохондріальної мембрани до індукторів відкриття МП.

Механізми, що лежать в основі протекторних впливів ІГТ, не виключають наявності спільних з ішемічним прекондиціонуванням сигнальних шляхів, поглиблине вивчення яких та їх захисних механізмів потребує подальших в цьому напрямку зусиль дослідників.

G.L. Vavilova, T.V. Serebrovskaya, O.V. Rudyk, M.V. Belikova, E.E. Kolesnikova, T.V. Kukoba, V.F. Sagach

INFLUENCE OF THE INTERMITTENT HYPOXIA TRAINING ON THE SENSITIVITY OF PHENYLARSINEOXIDE-INDUCED MITOCHOHDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN RAT HEART

On the mitochondria isolated from the heart tissue of adult rats we studied the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening to its inductor – phenylarsine oxide (PAO) after mitochondrial swelling, registered by spectrophotometric technique at л=520 nm. In adult rat under influence of two modes of normobaric intermittent hypoxic training (IHT): i) softer but prolonged one induced by breathing in normobaric chamber with 11% O2 gas mixture, 15 minuets sessions with 15 minuets rest intervals, 5 times daily (first mode) and ii) more severe but shorter one induced by breathing with 8 % O2 gas mixture (second mode) were used. The intensity of lipid peroxidation and antioxidant defense mechanisms in rat organism were estimated before and after IHT by measuring malon dialdehyde (MDA) content and enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the blood and the liver. It has been shown that IHT in the first mode didn't essentially influence both on PAO – induced, cyclosporin A – sensitive mitochondrial swelling and indexes of lipid peroxidation as well as the SOD and CAT enzymatic activity. It was established that IHT in the second mode caused pronounced increase in MDA content both in the blood and the liver by 67 % and 32% respectively; considerable augmentation of SOD activity in this tissues (by 49% and 32% respectively) and CAT activity (by 18% and 43% respectively). Moreover, in forty five days the activity of SOD exceeded its initial level in three times in both the blood and the liver. It has been established that IHT in the second mode provoke to twice decrease in PAO-induced mitochondrial swelling as compared with mitochondria of the control group, and even in forty five days after IHT stopping the protective effect on mitochondrial PTP opening was well-preserved. These effects were completely abolished in the presence of an inhibitor – cyclosporin A (10^{-5} mol/l) that demonstrated mitochondrial swelling to be due to the mitochondrial PTP opening. Our experiments showed that the influence of IHT in more severe mode decreased the sensitivity of mitochondria to the PAO in rat heart mitochondria. Thus resistance of the mitochondrial membrane to an inductor of PTP opening – PAO increase under the influence of IHT in the second mode.

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ельчанинова С.А., Смагина И.В., Кореняк Н.А., Варшавский Б.Я. Влияние интервальной гипоксической тренировки на процессы перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных

ферментов // Физиология человека. – 2003. – **29**, №3. – С. 72–75.
2. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб.дело. – 1988. – 1. – С. 16–19.
3. Кургалюк Н.М., Серебровська Т.В.. Вплив інтервальних гіпоксичних тренувань на антиоксидантну систему і перекисне окиснення ліпідів при дії гострої гіпоксії і донора оксиду азоту// Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 1. – С. 69–71.
4. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота //Биохимия. – 1998. – **63**, вып. 7. – С. 992–1006.
5. Семенов В.Л., Ярош А.М. Влияние гипоксии на окислительное фосфорилирование и перекисное окисление липидов митохондрий печени крыс при воспалении легких // Укр. биохим. журн. – 1991. – **63**, №2. – С. 95–101.
6. Серебровська Т.В., Кургалюк Н.М., Носар В.І.,Колєснікова Є.Е. Вплив інтервальних гіпоксичних подразнень та екзогенного оксиду азоту на процеси енергозабезпечення та ліпопероксидації у печінці щурів за умов гострої гіпоксії// Фізіол. журн. – 2001. – **47**, №1. – С. 85–92.
7. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В., Струтинська Н.А. Вивільнення неідентифікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори серця щурів // Там само. – 2003. – **49**, №5. – С. 3–12.
8. Рудик О.В., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А. та ін. Чутливість феніларсиноксид-індукованого відкриття мітохондріальної пори в серці старих щурів та за умов впливу на них інтервальних гіпоксичних тренувань // Там само. – 2004. – **50**, №5. – С. 29–37.
9. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
10. Argaud L., Gateau-Roesch O., Muntean D. et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – №38. – P. 367–74.
11. Beguin P.C., Joyeux-Faure M., Godin-Ributo D. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia // J. Appl. Physiol. – 2005. – в друці.
12. Chen C.H., Chern C.L., Lin C.C. et al. Involvement of reactive oxygen species, but not mitochondrial permeability transition in the apoptotic induction of human SK-Hep-1 hepatoma cells by shikonin// Planta Med. – 2003. – **69** (12). – P. 1119–1124.
13. Crompton M., Barksly E., Jonson N., Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death // Biochemie. – 2002. – **84**. – P. 143–152.
14. Da Lozzo E.J., Oliveira M.B., Carnieri E.G. Citrinin-induced mitochondrial permeability transition // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 1998. – **12**(5). – P. 291–297.
15. Galindo M.F., Jordan J., Gonzalez-Garcia C., Cena V. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria// Brit. J. Pharmacol. – 2003. –**139**(4). – P. 797–804.
16. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // Cardiovasc. Res. – 2004. – **61**. – P. 372–385.
17. Hausenloy D.J., Yellon D.M., Mani-Babu S., Duchen M.R. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat Physiol. – 2004 – **287**(2). – P. H841–H849.
18. Jordan R.A., Schenkmann J.B. Relationship between malonildialdehyde production and arachodinate consumption during NADPH-supported microsomal lipid peroxidation. – Biochem. Pharmacol. – 1982. – **31**. – P. 1390–1400.
19. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Grijalba M.T. et al. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation// J. Biol. Chem. – 1996. – 9; **271**(6). – P. 2929–2934.
20. Leeuwenburgh C., Phaneuf S. Cytochrome c release from mitochondria in the aging hear: a possible mechanism for apoptosis with age // Amer. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol. – 2002. – **282**. – P. R423–R430.
21. Negrelo Newton A.P., Cadena S.M., Merlin Rocha M.E. et al. New data on biological effects of chlorhexidine: Fe^{2+} induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition // Toxicol. Lett. – 2004. –**151**(3). – P. 407–416.
22. Nishikimi M., Appaji N., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen // Biochem. and Biophys. Res.Commun. – 1972. – **46**(2). – P. 849–854.
23. Park T.H., Kwon O.S., Park S.Y. et al. N-methylated beta-carbolines protect PC12 cells from cytotoxic effect of MPP^+ by attenuation of mitochondrial membrane permeability change// Neurosci. Res. – 2003. – **46**(3). – P. 349–358.
24. Prabhakar N.R., Kumar G.K. Oxidative stress in the systemic and cellular responses to intermittent hypoxia // Biol. Chem. – 2004. – **385**, №3–4. – P. 217–221.
25. Sharp F. R., Ran R., Lu A. et al. Hypoxic Preconditioning Protects against Ischemic Brain Injury// J. Amer. Sci. Exp. Neur. Therap. – 2004. – **1**, №1. – P. 26–35.
26. Shen W., Hintze T., Wolin M. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption // Circulation. – 1995. – **92**. – P. 3505–3512.
27. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcino-

genesis // Free Rad. Biol. Med. – 1990. – **8**. – P. 583–599.
28. Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L.O. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes// J. Exp. Med. – 2000. – **192**(7). – P. 1001–1014.
29. Vanden Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z. et al. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**(29). – P. 18092–18098.
30. Vannucci R.C., Towfighi J., Vannucci S.J. Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: pathologic and metabolic correlates / / J. Neurochem. – 1998. – **71**(3). – P.1215–1220.
31. Xu M., Wang Y., Hirai K. et al. Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2001. – **280**. – P. H899–H908.
32. Weiss J.N., Korge P., Honda H.M., Ping P. Role of mitochondrial permeability transition in myocardial disease // Circulat. Res. – 2003. – **93**. – P. 292–301.

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 06.06.2005