

Т.Г. Сазонтова, Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова, И.В. Бедарева, Е.А. Пылаева,  
Н.А. Кривенцова, А.А. Полянская, А.Р. Юрасов, Ю.В. Архипенко

## Роль активных форм кислорода и редокс-сигнализации при адаптации к изменению содержания кислорода

*Обзор литературы последних 15 лет с привлечением собственных экспериментальных данных посвящен проблеме участия активных форм кислорода (АФК) и редокс-сигнализации в индукции защитных систем клетки и формировании адаптационной резистентности организма. Даны современные представления о роли АФК в редокс-сигнализации, в индукции факторов транскрипции и белков с протекторной функцией, вариантах клеточного ответа при действии АФК, необходимых ограничениях при применении экзогенных антиоксидантов. Представлена концепция об участии АФК в неспецифической компоненте повышения резистентности организма. Обсуждены особенности нового, предложенного авторами способа адаптации к изменению содержания кислорода и приведены собственные экспериментальные данные об эффективности адаптации к периодической гипоксии-гипероксии от АФК-индуцирующих стрессорных повреждений различной природы.*

Участие ишемических, реперфузионных и гипоксических состояний в патогенезе различных заболеваний ставит перед современной медициной проблему повышения резистентности организма к этим повреждающим факторам. Один из основных механизмов их действия – активация свободнорадикального окисления, поэтому актуальным вопросом является коррекция состояний организма, связанных с чрезмерным содержанием активных форм кислорода (АФК). В качестве подобной защиты наиболее часто применяют антиоксиданты. Однако на фоне большого потока работ по антиоксидантной терапии в последние годы появляются сообщения о том, что применение природных и синтетических антиоксидантных средств в терапии, а особенно профилактике ряда заболеваний, не всегда приводит к благоприятному эффекту. Например, это касается от-

даленных, часто не учитываемых, последствий продолжительного применения антиоксидантов, поскольку большинство используемых препаратов могут вызывать подавление собственной, эндогенной системы антирадикальной защиты организма [8, 16, 18, 19, 28, 37].

Помимо отмеченного в ряде случаев отсутствия положительного результата антиоксидантной терапии заболеваний, формально опосредованных высоким содержанием АФК, отмечают, напротив, положительный эффект при использовании ограниченных по интенсивности прооксидантных воздействий, например, в результате широко применяемых за последние 20–30 лет полиненасыщенных жирных кислот в терапии и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому перспективными являются методы, позволяющие ограничивать чрезмерную активацию

© Т.Г. Сазонтова, Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова, И.В. Бедарева, Е.А. Пылаева, Н.А. Кривенцова,  
А.А. Полянская, А.Р. Юрасов, Ю.В. Архипенко

свободнорадикального окисления за счет индукции синтеза собственных защитных, и в частности, антиоксидантных систем, путем периодического, ограниченного по интенсивности АФК-сигнала. К таким методам относятся различные виды адаптационных тренировок, в том числе действие периодического изменения содержания кислорода. К последним относятся разные типы адаптации к гипоксии – периодическая гипобарическая гипоксия в барокамерах и интервальная нормобарическая гипоксическая тренировка.

*Роль АФК в редокс-сигнализации.* Из работ последних лет стало очевидным, что АФК играют важнейшую роль, участвуя при физиологических условиях в ключевых регуляторных механизмах живой клетки [31, 32, 38, 52]. В частности, они принимают участие в начальных этапах внутриклеточной сигнализации, которая является многокомпонентной системой передачи сигнала к клеточному ядру, и получила название редокс-сигнализации по начальному звену, чувствительному к окислительно-восстановительному состоянию [14, 21, 48].

В настоящее время известно множест-

во медиаторов и соответствующих им рецепторов, благодаря взаимодействию которых осуществляются различные специфические реакции. Типичный пример – катехоламины и соответствующие им адренорецепторы [15]. Однако для большого количества действующих агентов как внешнего, так и внутреннего происхождения, специфических рецепторов не обнаружено. Прежде всего это относится к действию гипоксии, температуры, а также различных окислителей, восстановителей и т.д. Тем не менее, клеточный ответ на эти воздействия развивается и без таких специфических рецепторов благодаря сигнальной цепи, именуемой редокс-сигнализацией. Кроме того, даже те медиаторы, которые имеют свои специфические рецепторы, действуют параллельно через активацию редокс-сигнализации. Недавними исследованиями установлена ключевая роль АФК в перекрестной активации рецепторов и cross-talk сигнальных путей, поскольку АФК образуются при активации самых разных рецепторов – гормональных, цитокиновых и т.д.

Реализация активации редокс-сигнального пути показана на рис. 1. После обра-

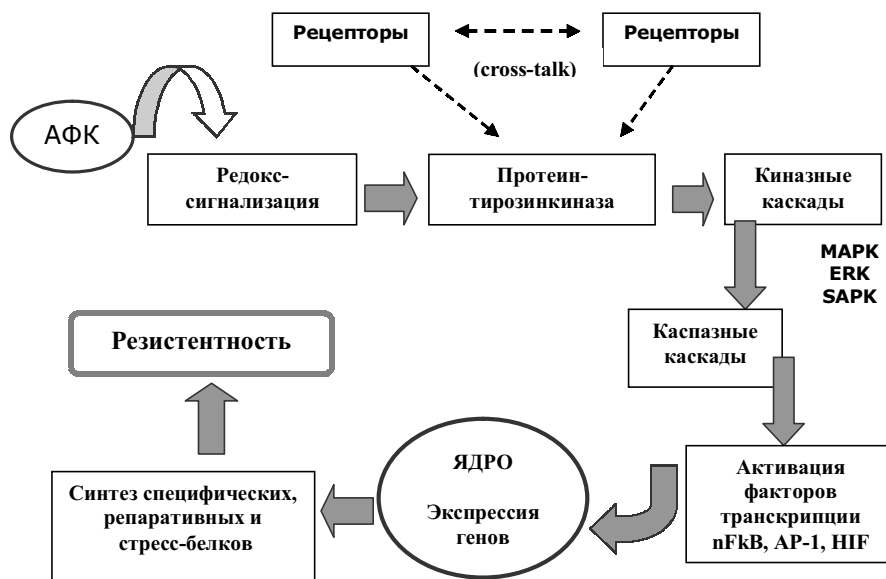


Рис. 1. Роль активных форм кислорода (АФК) в редокс-сигнализации и активации синтеза защитных белков

зования АФК происходит окислительно-восстановительная модификация сульфгидрильных групп сенсорных белков, от которых затем сигнал передается по уже известным регуляторным каскадам, работающим и при активации специфических рецепторов. Показано, что стадия активации протеинтирозинкиназы является общим звеном при специфическом и неспецифическом (АФК-зависимом) приеме внешнего сигнала. В дальнейшем индуцируются киназные и каспазные каскады, изменяется работа ионных каналов и т.д., что в свою очередь приводит к передаче сигналов следующим внутриклеточным медиаторам.

*Факторы транскрипции и белки с протекторной функцией.* Одним из важнейших следствий инициации редокс-сигнализации и АФК-опосредованной передачи сигнала является активация ядерных факторов транскрипции, которые индуцируют многочисленные гены белков с защитной функцией. В настоящее время большое значение придается таким факторам транскрипции, как NF- $\kappa$ B [24], AP-1 [34], NIF- $\alpha$ , NIF-3  $\alpha$  [13, 48, 56]. Последние играют важную роль при развитии гипоксических состояний, поскольку через активацию генома приводят к увеличению так называемых «гипоксических» белков, чья активность способствует адаптации и выживаемости клеток в условиях гипоксии.

Среди белков, синтезирующихся при АФК-сигнале, наибольшее значение имеют такие неспецифические молекулы, как ферменты антиоксидантной защиты, кристаллины, белки семейства HSP и другие белки срочного ответа, которые индуцируются в ответ на гипоксию, стресс, ишемию, реперфузию и другие воздействия [25, 34, 38, 39, 43, 58].

*Эндогенная защита и пути ее формирования.* АФК образуются при различных воздействиях на организм: стресс, воспаление, гипоксия, высокие и низкие температуры, физическая нагрузка, практически

все патологические состояния сопровождаются, помимо специфического ответа, и неспецифическим увеличением содержания АФК.

Кроме индукции АФК при внешних воздействиях, они образуются в организме постоянно, вне любых патологических состояний. Иными словами, образование АФК и свободнорадикальное окисление является естественным физиологическим процессом, постоянно протекающим в организме. Поэтому источниками АФК, в частности супероксидного анион-радикала, являются самые разные процессы, как экзогенные, так и внутриклеточные. Однако основные источники его образования – ферментативные системы: электронно-транспортная цепь митохондрий [5, 35] – митохондриальная цитохром-*c*-оксидаза, а также НАДФН-оксидаза фагоцитирующих клеток, ксантинооксидаза и микросомальные монооксигеназы [1, 3, 50, 59]. Помимо этого, значительный вклад в образование АФК вносит автоокисление катехоламинов [22], окисление тиолов, флавинов, хинонов, ксенобиотиков [23, 41, 53]. В гипоксических условиях процесс образования АФК сохраняется на высоком уровне за счет активации ксантинооксидазной системы [30, 36, 55], а также высвобождения индукторов образования АФК – металлов с переменной валентностью, в частности железа и меди от гемопротеинов – гемоглобина, цитохромов, церуллоплазмينا, супероксиддисмутазы [2, 43].

Таким образом, в организме, во-первых, существуют постоянные источники АФК, даже в условиях сниженного содержания кислорода, во-вторых, множественные системы индукции АФК дублируют друг друга, подчеркивая необходимость существования свободнорадикальных процессов для жизнедеятельности клетки. Иными словами, в клетке, несмотря на небезопасность использования АФК, идет постоянное их образование.

Образующиеся АФК участвуют в двух разнонаправленных, но постоянно протекающих физиологических процессах – катаболизме старых и синтезе новых молекул. В период катаболизма разрушаются старые или поврежденные биологические молекулы, при этом АФК и свободнорадикальное окисление являются непосредственными участниками и движущей силой такого обновления. С помощью АФК в клетке происходит окисление тех липидов и белков, которые должны быть подвержены деструкции. Это облегчает дальнейшее действие ферментов деградации, поскольку они имеют гораздо большее сродство именно к окисленному субстрату [9, 54, 57]. Таким образом, АФК включены в постоянно протекающие катаболические процессы.

С другой стороны, АФК участвуют в синтезе. Именно с помощью свободнорадикального окисления полиненасыщенных жирнокислотных остатков фосфолипидов, составляющих биологические мембраны, происходит синтез таких физиологически активных веществ липидной природы, как лейкотриены, тромбоксаны, простагландины [26, 29, 42].

Поэтому, участвуя в катаболизме и синтезе, АФК способствуют адаптации клетки к новым условиям среды, изменяя состав мембранных фосфолипидов и обновляя белковый спектр.

Помимо основной, физиологической роли, присущей АФК, давно известно, что избыточное их содержание в живой клетке может быть, как повреждающим фактором, нарушая структуру и функционирование внутриклеточных компонентов, включая ДНК, и развитием патологических состояний. Поэтому одним из универсальных механизмов защиты организма является синтез эндогенных протекторных неспецифических факторов.

Таким образом, в результате каскада редокс-сигнализации клетка насыщается

молекулами, которые повышают ее защиту от самых разных повреждающих экзогенных и эндогенных воздействий, действие которых опосредованно индукцией свободнорадикального окисления.

Ясно, что чем выше защитный барьер клетки, тем большую защиту будут иметь ее структуры от действия повреждающих факторов. При этом наиболее действенный барьер – не внешний, созданный с помощью экзогенных добавок, подавляющих свободнорадикальное окисление, а именно, эндогенный уровень защиты, т.е. сформировавшийся в самой клетке. В экспериментах оказалось, что ингибирование свободнорадикального окисления с помощью добавки внешних антиоксидантов не приводит к активации защитных систем организма и не оказывает долговременного защитного эффекта. Это было впервые показано на примере добавок антиоксидантов в диетическое питание, обогащенное прооксидантами – полиненасыщенными жирными кислотами класса  $\omega$ -3 ( $\omega$ -3 ПНЖК). Появилось предположение о том, что повышение содержания АФК является необходимой стадией проявления положительного кардиопротекторного действия  $\omega$ -3 ПНЖК [27]. Действительно [37], потребление антиоксиданта витамина Е снижает проявление некоторых биологических эффектов  $\omega$ -3 ПНЖК, поэтому рекомендовано их применение без антиоксидантов.

С учетом последних данных о редокс-сигнализации становится понятна причина этого явления (рис. 2). Возвращаясь к факторам транскрипции, т.е. тем соединениям, которые непосредственно активируют генетический аппарат клетки, нужно иметь в виду, что у них есть активаторы и ингибиторы. При этом индукторами активации различных факторов транскрипции выступают АФК, в то время, как антиоксиданты блокируют активацию NF- $\kappa$ B, AP-1 и других факторов транскрипции. Поэтому при активации АФК-опосредованного

окисления происходит индукция факторов транскрипции, что в свою очередь приводит к синтезу протекторных белков, среди которых наиболее важными являются репаративные белки, способствующие восстановлению структуры и функции белков и нуклеиновых кислот, а также ряд специфических белков, среди которых ферменты антиоксидантной защиты занимают существенное место. В то же время по мере повышения в результате этих процессов содержания антиоксидантов, происходит ингибирование факторов транскрипции и, следовательно, синтез защитных белков прекращается. Таким образом, синтез протекторных систем идет лишь до момента компенсации АФК-сигнала и для того, чтобы вновь индуцировать защитные системы, необходим новый АФК-сигнал, т.е. данный процесс является дискретным. Поскольку повторной активации синтеза защитных структур можно ожидать только при повторном действии прооксидантов, то с помощью поступления периодических, дискретных свободнорадикальных сигналов и следующей за ними индукции защитных систем и реализуется основной принцип периодической адаптации.

*Участие АФК в неспецифической компоненте резистентности организма.* Важно, что при различных видах адаптации используются повторяющиеся воздействия, сопровождающиеся, как показано за последнее десятилетие периодической активацией АФК [45], что ведет к увеличению резистентности организма к свободнорадикальному окислению. За последние годы на основе многочисленных работ по соотношению прооксидантов и антиоксидантов при острых и адаптационных воздействиях нами была сформулирована концепция участия АФК в создании неспецифической компоненты повышения резистентности организма при периодически действующем факторе. Результатом ответа клетки на повторяющийся свободнорадикальный сигнал и включение редокс-сигнального каскада является периодическая активация соответствующих факторов транскрипции и синтез защитных внутриклеточных компонентов, в том числе с антиоксидантной функцией [12, 47].

Важно, что повторяющаяся, ограниченная генерация АФК является механизмом повышения резистентности организма при самых разных воздействиях. Это пока-

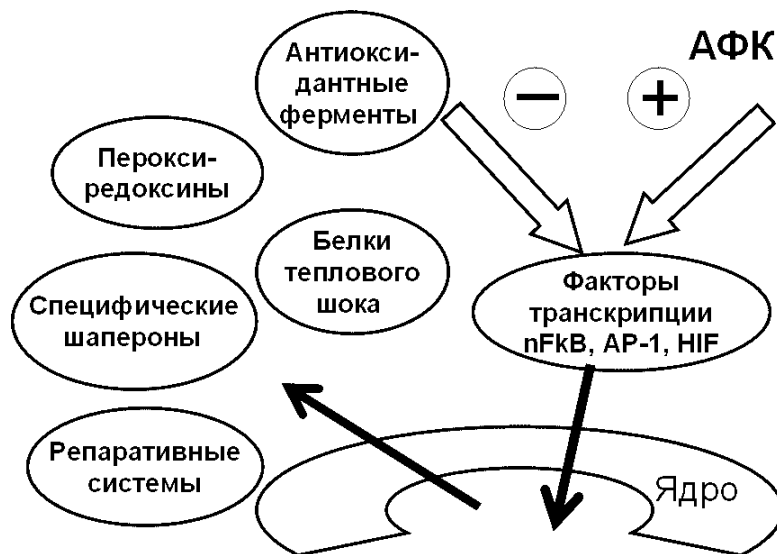


Рис. 2. Спектр экспрессии защитных белков, индуцированной активными формами кислорода (АФК). Указаны активаторы (+) и ингибиторы (-) факторов транскрипции

зано при стрессе [8], физической тренировке [11, 40], холодовой адаптации [51], применении пищевых адаптогенов [20, 44, 49], диеты, обогащенной субстратами окисления –  $\omega$ -3 ПНЖК [10, 27], а также при гипобарической интервальной гипоксической тренировке [17]. В последнее десятилетие появились данные о сходстве механизмов защитного действия не только периодических видов снижения содержания кислорода, как при действии гипо- или нормобарических гипоксических тренировок, но и периодического увеличения содержания кислорода, как в случае гипербарической оксигенации в адаптационном режиме [4].

Таким образом, кардинальный принцип адаптации, заключающийся в периодичности действия адаптирующего фактора, в настоящее время может быть сформулирован, как периодически действующий фактор, инициирующий активацию свободнорадикального сигнала.

Приняв это за основу, ясно, что повышение устойчивости к гипоксическим, ишемическим и реперфузионным воздействиям, может быть реализовано при адаптации организма к периодическому изменению содержания кислорода. При этом конкретный способ достижения такого изменения становится вторичным фактором, а на первый план выдвигается общий принцип адаптации клетки к периодическому увеличению и снижению, новому увеличению, снижению и т.д. содержания кислорода, т.е. к периодической активации свободнорадикального окисления. Благодаря этому, не только различные виды адаптации к гипоксии имеют сходные молекулярные основы повышения резистентности клеток, но и периодическое действие гипероксии при применении гипербарической оксигенации, несмотря на внешне значительную разницу, имеют общие закономерности. В совместной работе с Масловым [33] мы использовали газохроматографическое

определение пентана в выдыхаемом воздухе пациентов с ишемической болезнью сердца I-II степени. Оказалось, что введение в комплексную терапию интервальной нормобарической гипоксии или периодической гипербарической гипероксии эффективно и практически в равной степени ингибирует процессы свободнорадикального окисления при лечении таких больных, что подтверждает наличие общих механизмов этих адаптационных воздействий на организм.

*Новый способ адаптации к изменению содержания кислорода.* В последние годы с учетом обнаруженных общих механизмов формирования адаптационной резистентности к действию гипоксии и умеренной гипероксии нами был предложен новый вид адаптации к изменению содержания кислорода. Он включает периоды гипоксии и умеренной гипероксии, при этом его особенностью является увеличение интенсивности свободнорадикального сигнала по сравнению с классической интервальной нормобарической гипоксией (Патент № 2289432; 20.12.2006 г.; Грант РФФИ 05-04-08102-офи\_а). Важно, что при подобном, но более интенсивном адаптационном режиме значительно быстрее, чем при классической интервальной гипоксии – нормоксии достигался защитный эффект у больных пациентов с ишемической болезнью сердца, хотя не было зарегистрировано изменений в липидном спектре крови или энергетическом обмене [6]. Введение гипероксической компоненты в классическую интервальную нормобарическую гипоксию ранее применялось крайне редко и лишь на основе эмпирических наблюдений. Поэтому вполне понятно, что не существует работ по обоснованию и изучению механизмов такого способа адаптации. Более того, уровень гипероксии, как правило, составлял 50–60 %, а время воздействия было значительным.

В нашу задачу в связи с этим входило следующее:

а) разработка способов адаптации к изменению содержания кислорода на основе смены гипоксических (не ниже 10 % O<sub>2</sub>) и умеренно гипероксических (не более 30 % O<sub>2</sub>) интервалов. Такая адаптация должна обладать повышенным АФК-сигналом по сравнению с классической адаптацией к гипоксии, но не повреждать чувствительные к действию АФК органы;

б) сравнение уровня защитных систем и формирования резистентности мембранных структур сердца, печени и мозга после курса интервальной нормобарической гипоксии и тренировки, сочетающей периоды гипоксии и гипероксии;

в) проверка эффективности адаптации к гипоксии–гипероксии от АФК-индуцирующих стрессорных повреждений различной природы.

За последних 5 лет получены следующие основные результаты:

а) метод интервальной нормобарической гипоксии относится к мягким адаптационным воздействиям, опосредованным периодической низкоинтенсивной индукцией АФК. При его длительном применении (23 сут) нами ранее [46] было отмечено повышение резистентности к действию АФК

мембранных структур сердца, печени и коры головного мозга. Однако формирование протекторного эффекта за более короткое время требует увеличения АФК-сигнала, что нежелательно, поскольку углубление гипоксии ниже 10 % приводит к отрицательным последствиям на уровне наиболее чувствительных к действию АФК органов (рис. 3). Поэтому, чтобы увеличить АФК-сигнал, мы заменили период нормоксии в классической адаптации к гипоксии на периоды умеренной гипероксии, что привело к двукратному усилению, но без углубления гипоксической составляющей.

В результате была использована более короткая тренировка в 2 режимах – классической адаптации – интервальной нормобарической гипоксия и нового вида тренировки – гипоксия и гипероксия (15 сут, 3–5-минутные интервалы 10 % гипоксии и 30 % гипероксии, по 60 мин ежедневно), что соответствует окончанию периода срочной адаптации. Воздушная смесь со сниженным и повышенным содержанием O<sub>2</sub> создавалась в специальных блоках с помощью установки, работающей по принципу мембранного деления газов. Установка является оригинальной разработкой лабо-

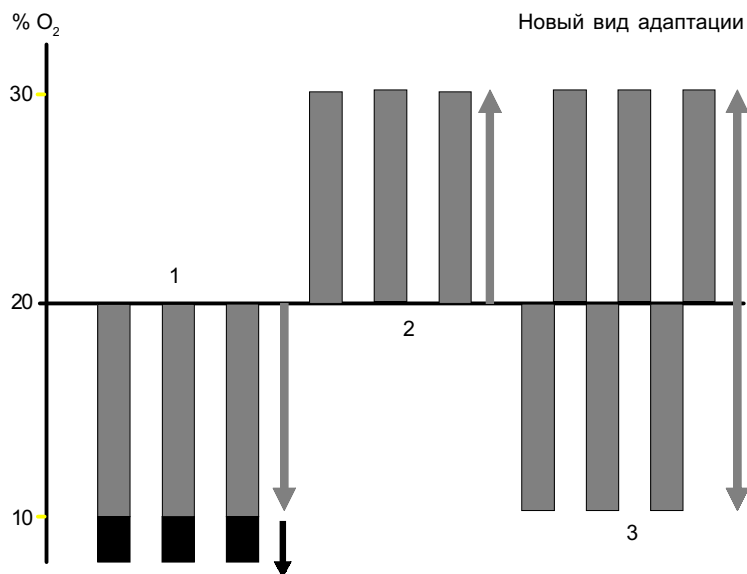


Рис. 3. Рис. 3. Виды адаптации к изменению содержания кислорода: 1 – гипоксия-нормоксия, 2 – гипероксия-нормоксия, 3 – гипоксия-гипероксия

ратории адаптационной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова совместно с фирмой «Метакс»;

б) оценка уровня защитных систем в органах показала:

классическая интервальная нормобарическая гипоксия в 15-суточном режиме приводила к достоверному увеличению активности СОД в печени, мозгу и сердце – на 19, 21 и 20 % соответственно, активности каталазы в сердце на 30 % от контроля, а также снижению глутатионредуктазы – в печени на 28 %, в мозгу – на 34 % от контроля. Таким образом, после интервальной нормобарической гипоксии в сердце зарегистрирована активация ферментов антиоксидантной защиты, в мозге и печени она слабее или отсутствует, а некоторые ферменты антиоксидантной защиты ингибируются. Это позволяет предположить больший защитный эффект кратковременной интервальной нормобарической гипоксии на ткань миокарда, более слабый на мозг и печень.

При изучении резистентности внутриклеточных мембранных структур этих органов наши предположения были подтверждены.

В печени после кратковременной интервальной нормобарической гипоксии повышается чувствительность ткани к индукции

АФК-опосредованных процессов (скорость накопления продуктов окисления увеличена от контроля через 40 мин на 33 % ( $P < 0,05$ )). В отличие от адаптации к интервальной нормобарической гипоксии, при которой чувствительность печени к индукции свободнорадикального окисления повысилась, т.е. ее устойчивость к АФК снижена, новый вид адаптации, сочетающий периоды гипоксии и гипероксии, не снижал резистентность мембран печени к АФК (рис. 4,а). Важно, что в отличие от интервальной нормобарической гипоксии, 15 дней тренировки для режима гипоксия–гипероксия достаточно для формирования устойчивой стадии адаптации, при которой адаптирующий фактор часто скомпенсирован. Действительно, после адаптации к гипоксии и гипероксии зарегистрировано отсутствие стрессорной и гипоксической компонент, о чем судили по возвращению к контрольному уровню активности ферментов антиоксидантной защиты и отсутствию синтеза индуцибельных форм белков срочного ответа – HSP70 и HSP32 – гемоксигеназы-1 (Western-блот, моноклональные антитела к HSP70 и HSP32, вторые антитела с пероксидазной меткой).

В сумме эти данные свидетельствуют о наличии защитного эффекта режима гипоксии

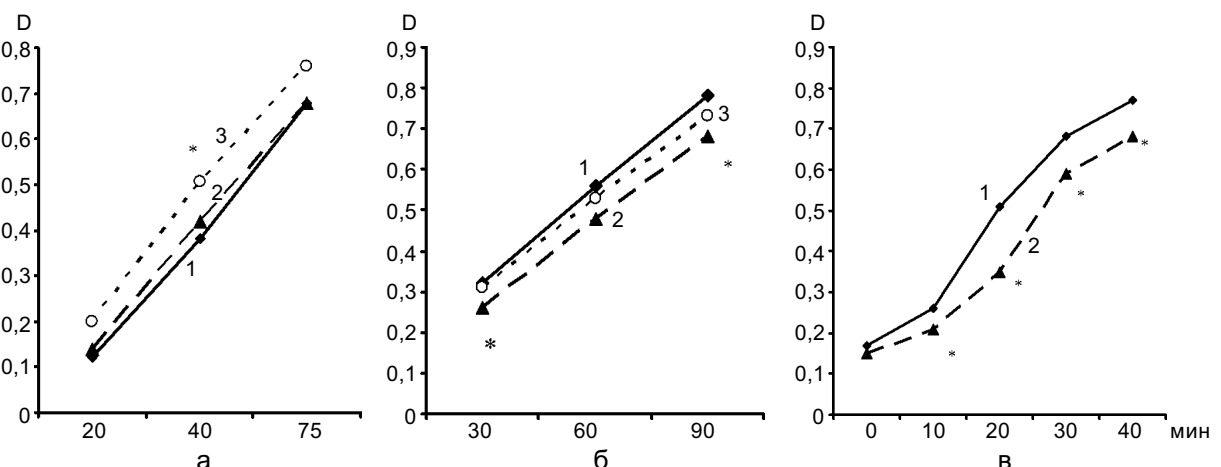


Рис. 4. Влияние адаптации к изменению содержания кислорода, накопление ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* в системе с аскорбатом: а – печень, б – мозг, в – сердце; 1 – контроль, 2 – гипоксия и гипероксия, 3 – гипоксия и нормоксия



и гипероксии, в том числе на уровне высокочувствительной к действию АФК печени.

В мозгу изменения ферментов антиоксидантной защиты носят сходный характер при режимах интервальной нормобарической гипоксии и гипоксии, а также гипероксии. Тем не менее, уровень накопления продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* различается (см. рис. 4,б). При адаптации интервальной нормобарической гипоксии резистентность ткани мозга к действию АФК не отличается от контроля, в то время как при гипоксии и гипероксии устойчивость к АФК увеличена. Так, содержание продуктов окисления достоверно снижается от контроля через 30 мин индукции окисления на 19 % ( $P \leq 0,01$ ) и через 90 мин – на 13 % ( $P \leq 0,05$ ).

Таким образом, адаптация в режиме гипоксии и гипероксии вызывала большую устойчивость ткани мозга к индукции свободнорадикального окисления.

В сердце кратковременная (15 сут) адаптация к гипоксии и гипероксии не увеличивала активность СОД, каталазы и глутатионредуктазы, а также экспрессии HSP70 и HSP32, которые с одной стороны являются маркерами повреждения, а с

другой, – выполняют защитную функцию от действия АФК в клетке. Это означает, что к 15-м суткам адаптации к гипоксии и гипероксии произошло снижение интенсивности свободнорадикального сигнала, т.е. достижение стадии долговременной адаптации, несмотря на уменьшенное время тренировки. При этом резистентность мембранных структур сердца к индукции свободнорадикального окисления после адаптации к гипоксии и гипероксии увеличилась (см. рис. 4,в). Так, уровень накопления свободнорадикальных продуктов при его индукции *in vitro*, после тренировки был на 20–30 % ( $P \leq 0,01$ ) ниже по сравнению с контролем.

Кроме того, после адаптации к гипоксии и гипероксии повысилась устойчивость кальций-транспортирующей системы саркоплазматического ретикулаума миокарда к действию повреждающих факторов – низкой концентрации  $Ca^{2+}$  – на 59 % ( $P \leq 0,01$ ) и к кальциевой нагрузке – на 18 % ( $P \leq 0,05$ ), а также к действию автолиза и индукции свободнорадикального окисления (рис. 5).

Таким образом, по разделу б) можно заключить следующее:

1) показана принципиальная возмож-

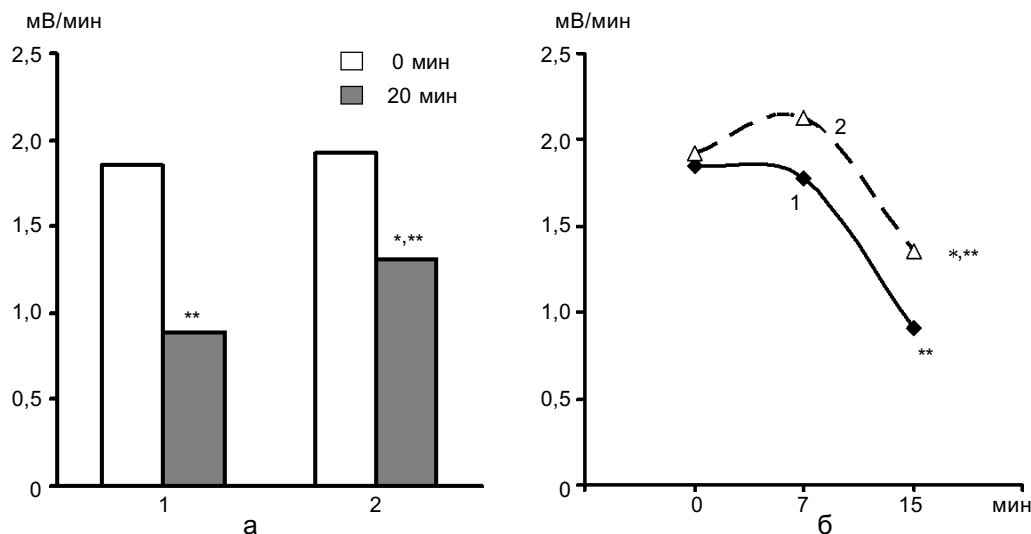


Рис. 5. Влияние адаптации к гипоксии-гипероксии на устойчивость кальциевого насоса саркоплазматического ретикулаума миокарда: а – к действию автолиза, б – к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*; 1 – контроль, 2 – гипоксия и гипероксия. \* по сравнению с контролем, \*\* по сравнению с исходным состоянием

ность достижения устойчивого защитного эффекта при применении адаптации, сочетающей периоды гипоксии и умеренной гипероксии.

2) введение гипероксической компоненты в классический режим интервальной нормобарической гипоксической тренировки без углубления гипоксии повышает резистентность ткани печени, чувствительной к действию АФК.

3) режим комплексного применения гипоксических и умеренно гипероксических периодов позволяет получить эффект стойкой адаптационной защиты при снижении времени тренировок.

Это означает, что с помощью введения гипероксической компоненты эффект классической интервальной нормобарической гипоксической тренировки может быть достигнут раньше и в более мягких условиях, что особенно важно в случае применения данного вида тренировки в комплексной терапии и профилактике;

в) самые последние работы были направлены на проверку эффективности нового вида адаптации к гипоксии и гипероксии при стрессорной индукции АФК:

1) оценивали антистрессорное влияние двух видов кратковременной адаптации – интервальная нормобарическая гипоксия, а также гипоксия и гипероксия на модели гипоккинезии (антиортостатическое вывешивание крыс линии Вистар массой 250 г, 3 ч, на опоре только передние лапы по методу Morey-Holton). После острой гипоккинезии в печени в 2,5–3 раза увеличивается скорость накопления продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* (рис. 6), что свидетельствует о присутствии выраженной стрессорной компоненты. Кратковременный курс адаптации к интервальной нормобарической гипоксии имел частичный защитный эффект от такого стресса, что выражалось в 25%-м снижении интенсивности окисления, а добавление гипероксической компоненты в адаптацию к гипоксии (гипоксия и гипероксия) значи-

тельно повышало выраженность протекторного антистрессорного эффекта – резистентность клеточных мембран печени повысилась по сравнению с животными без адаптации в 1,5–2 раза.

Относительно синтеза защитных белков срочного ответа показано, что в отличие от неизменной активности каталазы, значительно изменяется экспрессия стресс-индуцированного белка с протекторной функцией – HSP70, уровень которого одновременно характеризует интенсивность АФК-сигнала (рис. 7, 8). После гипоккинезии содержание HSP70 в скелетной мышце и сердце значительно повышено, предварительная адаптация снижает его в скелетной мышце на 22–47 %, в сердце в 4–4,2 раза, указывая на значительное подавление АФК-сигнала.

Таким образом, предварительная адаптация к гипоксии и гипероксии предупреждает стресс-индуцированное увеличение интенсивности АФК-сигнала при гипоккинезии;

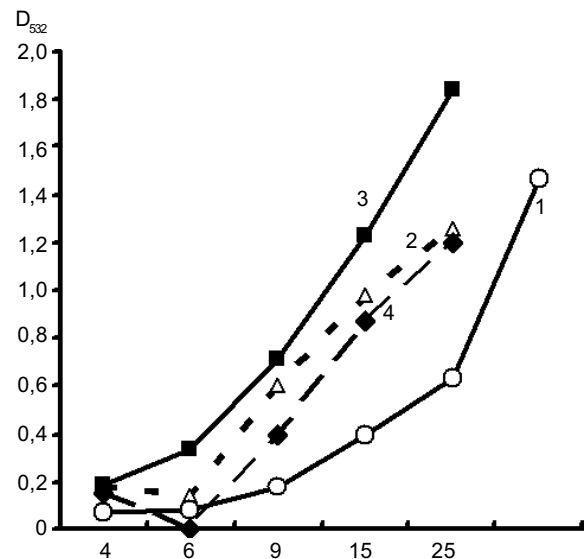


Рис. 6. Эффект предварительной адаптации к изменению содержания кислорода на интенсивность накопления продуктов свободнорадикального окисления в печени при гипоккинезии (индукция *in vitro* в системе с Fe<sup>2+</sup>-аскорбат): 1 – контроль, 2 – адаптация к гипоксии-нормоксии и гипоккинезии, 3 – адаптация к гипоксии-гипероксии и гипоккинезия, 4 – обдувка воздухом и гипоккинезия

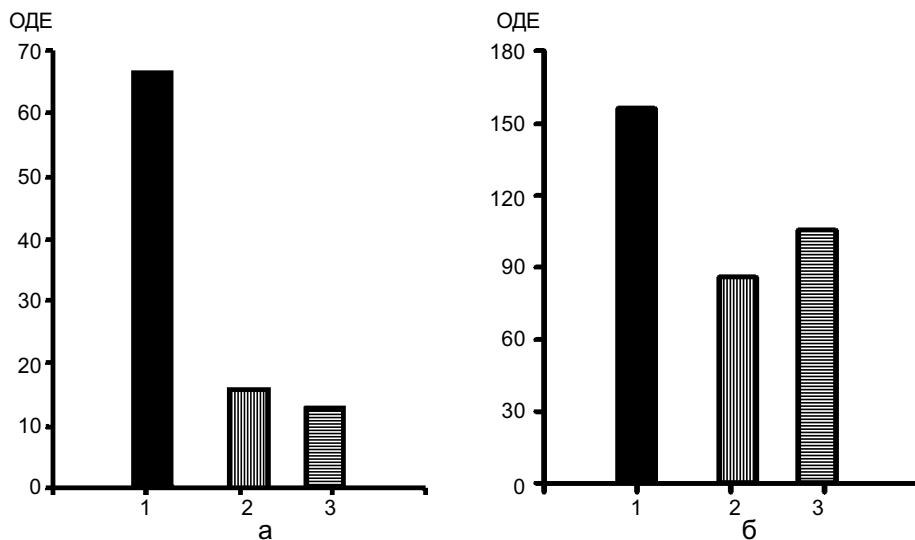


Рис. 7. Эффект предварительной адаптации к изменению содержания кислорода на экспрессию стресс-белка HSP70 (Western blot-анализ) при гипокинезии в сердце (а) и скелетной мышце (б): 1 – обдувка воздухом и гипокинезия, 2 – адаптация к гипоксии-нормоксии и гипокинезия, 3 – адаптация к гипоксии-гипероксии и гипокинезия. ОДЕ – относительные денситометрические единицы

2) другим тестирующим стрессорным воздействием явилась истощающая физическая нагрузка – плавание до отказа. При однократном плавании адаптация к интервальной нормобарической гипоксии не обладает защитным действием, в отличие от нового способа адаптации к гипоксии и гипероксии, после которого животные плавали значительно дольше (рис. 9). При трехкратной нагрузке, продемонстрирована эффективность обоих видов адаптации, однако эффект нового вида – гипоксия и гипероксия – был выше.

Однократное плавание до отказа приводит к резкому (в 2,9 раза) увеличению в сердце экспрессии HSP 70 по сравнению с контролем (рис. 10), что свидетельствует о значительной стрессорной компоненте этого воздействия и чрезмерного АФК-сигнала. Это подтвердилось в тесте на устойчивость мембранных

структур печени к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* (рис. 11). После однократной физической нагрузки чувствительность печени к АФК-процессам возрастает на 18–34 % от контроля. Оба вида адаптации эффективно предупреждают чрезмерную интенсивность свободнорадикальных процессов при острой физической нагрузке и возвращают ее к контрольному уровню. Более того, после предварительной адаптации к интервальной нормобарической гипоксии и к гипоксии и гипероксии в 1,8–3,7 раза снижается содержание стресс-индуцибельного белка HSP70 относительно физической нагрузки без адаптации (см. рис. 10).

Таким образом, адаптация к изменению содержания кислорода эффективно компенсирует чрезмерный АФК-сигнал при острой

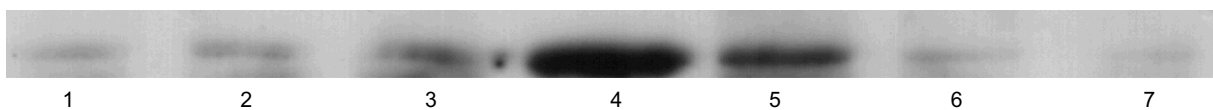


Рис. 8. Оригинальные денситограммы содержания HSP70 в скелетной мышце (1-3) и в сердце (5-6) при гипокинезии (3 ч) без и на фоне предварительной адаптации: 1 – адаптация к гипоксии-нормоксии и гипокинезия, 2 – адаптация к гипоксии-гипероксии и гипокинезия, 3 – обдувка воздухом и гипокинезия, 4 – обдувка воздухом и гипокинезия, 5 – адаптация к гипоксии-нормоксии и гипокинезия, 6 – адаптация к гипоксии-гипероксии и гипокинезия

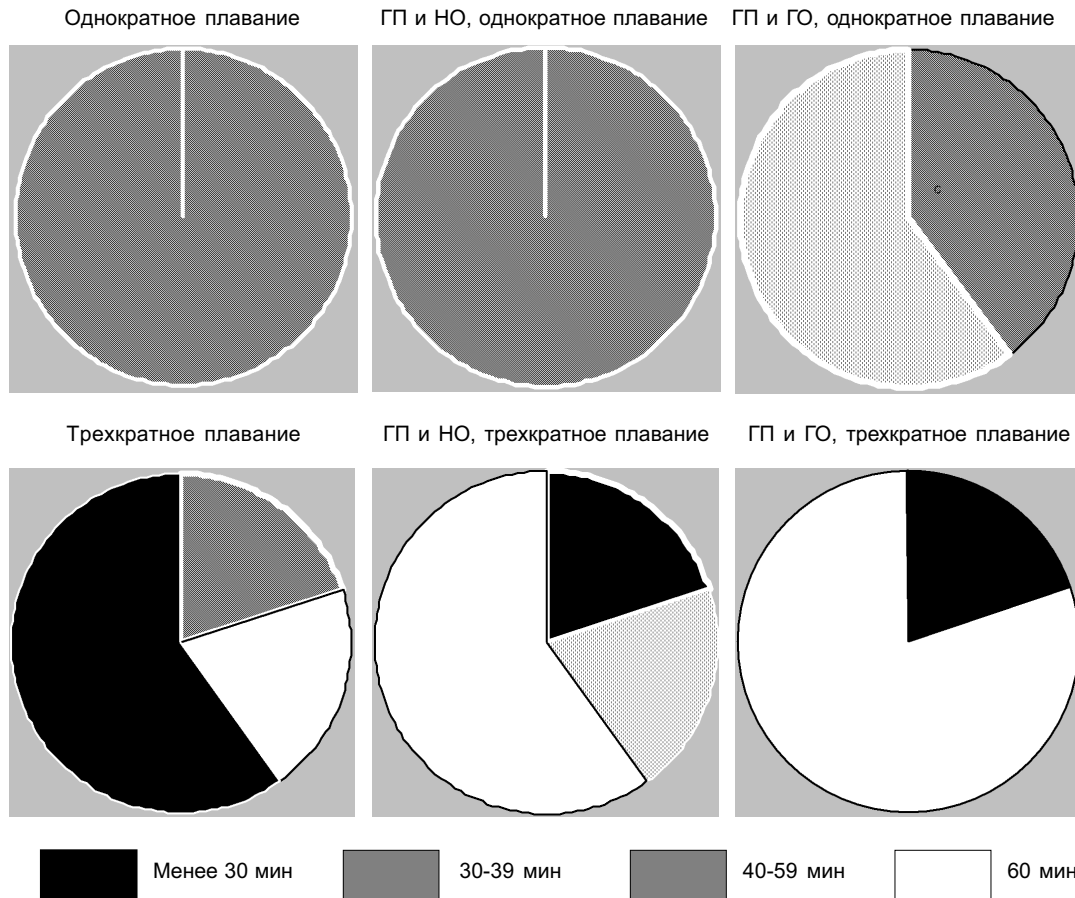


Рис. 9. Увеличение длительности плавания до отказа после предварительной адаптации к изменению содержания кислорода – к гипоксии-нормоксии (ГП и НО) и к гипоксии-гипероксии (ГП и ГО) при однократном и трехкратном плавании (по одному плаванию в каждый из трех последовательных дней)

физической нагрузке, а длительность самого плавания значительно увеличивается при новом виде адаптации – к гипоксии и гипероксии.

Следует отметить, что адаптационные тренировки с использованием изменения содержания кислорода во вдыхаемом воздухе приводят к дозированной индукции АФК-сигнала и синтезу протекторных компонентов, защищающих клетку от чрезмерного увеличения содержания АФК при различных стрессорных нагрузках.

С учетом тканеспецифичности проявления ответа на один и тот же внешний стимул и индивидуальной чувствительности к действию повреждающих факторов, чрезвычайно важным, на наш взгляд, является

расширение спектра используемых гипоксических тренировок, среди которых находится и адаптация к периодической гипоксии и гипероксии – способ увеличения интенсивности адаптирующего АФК-сигнала без углубления гипоксической компоненты.

**T.G.Sazontova, N.A.Anchidhkina, A.G.Zhukova, I.V.Bedareva, E.A.Pylaeva, N.A.Krivencova, A.A. Polianskaya, A.R. Iurasov, Yu.V.Arhipenko**

#### **ACTIVE OXYGENE FORMS AND REDOX-SIGNALING ROLE IN ADAPTATION TO OXYGENE CONTENTS CHANGING**

Review of last 15 years literature and own experimental data on role of reactive oxygen species (ROS) and redox signalization in induction of cell protective systems and development

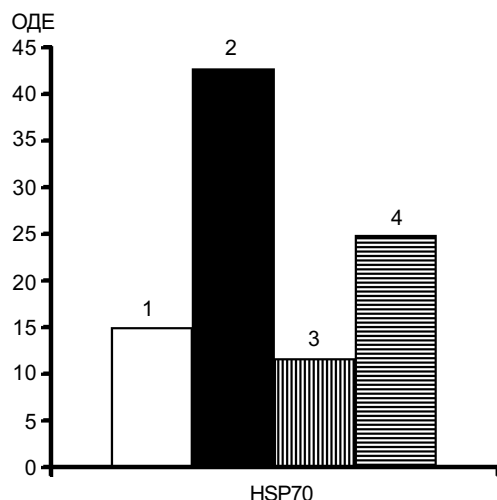


Рис. 10. Содержание стресс-индуцибельного белка срочного ответа – HSP70 в сердце крыс при однократной физической нагрузке плаванием. ОДЕ – относительные денситометрические единицы (Western blot-анализ): 1 – контроль, 2 – физическая нагрузка, 3 – физическая нагрузка на фоне предварительной адаптации к гипоксии-нормоксии, 4 – физическая нагрузка на фоне адаптации к гипоксии-гипероксии

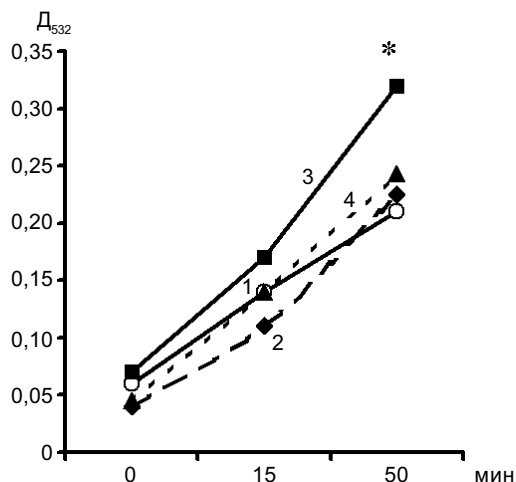


Рис. 11. Уровень накопления ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления в печени при однократной физической нагрузке плаванием: 1 – контроль, 2 – физическая нагрузка, 3 – физическая нагрузка на фоне предварительной адаптации к гипоксии-нормоксии, 4 – физическая нагрузка на фоне адаптации к гипоксии-гипероксии. \*P<0,05 по сравнению с контролем

of adaptive resistance. Modern ideas of ROS involvement in redox signalization, induction of transcription factors and protective proteins, ways of cell response to ROS, essential limitations of exogenic antioxidants are shown. Concept of ROS involvement in non-specific component of increase resistance is introduced. Peculiarities of author's method of adaptation to change oxygen level are discussed. Experimental data on efficacy of adaptation to periodic hypoxia/hyperoxia from ROS-induced stresses are presented.

Moscow State University named M.Lomonosov;  
State Research Common Pathology and Pathophysiology  
Institute Russian Academy Medical Sciences, Moscow

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М., Наука, – 1972.
3. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991. – 29. – 249 с.
4. Киселев С.О. Механизм действия ГБО на организм // Гипербар. физиол. медицина. – 2002. – 2. – С.3–7.
5. Леденев А.Н., Рууге Э.К. Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца в условиях

ишемии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1985. – 100 (9). – С. 303–305.

6. Маев Э.З., Козырев П.В., Виноградов Н.В. и др. Комплексное применение нормобарической интервальной гипокситерапии в сочетании с кислородно-воздушной реоксигенации, гало- и спелеотерапией при лечении патологии кардиореспираторной системы у лиц пожилого и старческого возраста. – В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. – М., 2004. – С.569–578.
7. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. – М.: Изд-во РАМН, 2000. – 51 с.
8. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., Меерсон Ф.З. Увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты сердца при адаптации крыс к коротким стрессорным воздействиям // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1987. – 103 (10). – С. 411–413.
9. Сазонтова Т.Г. Стрессиндуцированные изменения функционирования Са-транспортирующей системы саркоплазматического ретикулаума сердца и ее устойчивость к эндогенным повреждающим факторам // Там же. – 1989. – 108 (9). – С. 271–274.
10. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., Меерсон Ф.З. Адаптация к периодической гипоксии и диета с ПНЖК n-3 класса, обладающие кардиопротекторным действием, повышают устойчивость Са-

- транспорта саркоплазматического ретикулума миокарда к свободно-радикальному окислению // Там же. – 1995. – **120** (7). – С. 42–45.
11. Сазонтова Т.Г., Голанцова Н.Е., Меерсон Ф.З., Архипенко Ю.В. Противоположное влияние адаптации к физической нагрузке на миокард и скелетную мышцу. Са-транспортирующая система саркоплазматического ретикулума и ферменты антиоксидантной защиты // Там же. – 1996. – **122** (6). – С. 623–627.
  12. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Роль свободно-радикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2005. – **91**, №6. – С.636–655.
  13. Сазонтова Т.Г., Жукова А.Г., Анчишкина Н.А., Архипенко Ю.В. Фактор транскрипции HIF-1  $\alpha$ , белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии // Вестн. РАМН, 2007. – №2. – С.17–25.
  14. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти // Сорос. образ. журн. – 2001. – **7** (6). – С. 4–10.
  15. Ткачук В.А. Введение в молекулярную эндокринологию. – М.: Изд-во Москов. ун-та, 1983.
  16. Arkhipenko Yu.V., Sazontova T.G. Mechanisms of the cardioprotective effect of a diet enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids // Pathophysiology. – 1995. – **2** (2) – P. 131–140.
  17. Arkhipenko Yu.V., Sazontova T.G., Tkachouk E.N., Meerson F.Z. Adaptation to continuous and intermittent hypoxia: role of the active oxygen-dependent system. – In: Adaptation Biology and Medicine. Vol.1 Subcellular Basis / Eds. B.K.Sharma et.al. –New Delhi. Narosa Publishing House, 1997. – P.251–259.
  18. Barja G., Lopez Torres M. et al. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver // Free.Radic.Biol.Med. – 1994. – **17**, № 2. – P.105–115.
  19. Buckman T.D., Sutphin M.S., Mitrovic B. Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidant enzyme modulation // J.Neurochem. – 1993. – **60**, № 6. – P.2046–2058.
  20. Cai Y.N., Appelkvist E.L., Depierre J.W. Hepatic oxidative stress and related defenses during treatment of mice with acetylsalicylic acid and other peroxisome proliferators // J. Biochem. Toxicol. – 1995. – **10** (2). – P. 87–94.
  21. Chandel N.S., Schumacker P.T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight // J. Appl. Physiol. – 2000. – **88**. – P.1880–1889.
  22. Dhalla K.S., Rupp H., Beamish R.E., Dhalla N.S.<sup>2+</sup> Mechanisms of alterations in cardiac membrane Ca<sup>2+</sup> transport due to excess catecholamines // Cardiovasc. Drugs Theran. – 1996. – **10** (Suppl. 1.) – P.231–238.
  23. Dimascio P., Brivida K., Sasaki S.T. et al. The reaction of peroxynitrite with tert-butyl hydroperoxide produces singlet molecular oxygen // Biol. Chem. – 1997. – **378**. – P.1071–1074.
  24. Flohe L., Brigelius-Flohe R., Salion C. Redox regulation of NF-kappa B activation // Free Rad.Biol.Med. – 1997. – **22**. – P.1115–1126.
  25. Graven K.K., Zimmerman L.H., Dickson E.W. et al. Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific // J. Cell. Physiol. – 1993. – **157** (3). – P.544–554.
  26. Hemler M.E., Cook H.W., Lands W.E. Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides // Arch. Biochem. and Biophys. – 1979. – **193**. – P.340–345.
  27. Hu M.L., Frankel E.N., Leibowitz B.E., Tappel A.L. Effect of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates // J. Nutr. – 1989. – **119**. – P.1574–1582.
  28. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1995. – **209** (2). – P.104–111.
  29. Kalsner, S. The effect of hypoxia on prostaglandin output and on tone in isolated coronary arteries // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1977. – **55**. – P.882–887.
  30. Kuzmin A.I., Tskitishvili O.V., Serebryakova L.I. Allopurinol: kinetics, inhibition of xanthine oxidase, and protective effect in ischemic-reperfused canine heart as studied by cardiac microdialysis // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1995. – **25**. – P.564–571.
  31. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction // FASEB J. – 1997. – **11** (1). – P.118–124.
  32. Lee P.J., Alam J., Wiegand G.W., Choi A.M.K. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – **93**. – P.10393–10398.
  33. Maslov V.A., Sazontova T.G., Kostin A.I. Free radical oxidation in treatment of patients with ischemic heart disease by intermittent hypoxia and hyperoxia // Hypoxia Med. J. – 2004. – **12** (1–2). – P. 26–29.
  34. Maulik N., Goswami S., Galang N., Das D.K. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF- $\kappa$ B on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation // FEBS Lett. – 1999. – **443**. – P.331–336.
  35. McKenna M.J. Effects of training on potassium homeostasis during exercise // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1995. – **27** (4). – P.941–949.
  36. Miura T., Suzuki K., Shimamoto K., Imura O. Suppression of the degradation of adenine nucleotides during ischemia may not be a sufficient mechanism for infarct size limitation by preconditioning // Basic. Res. Cardiol. – 1996. – **91**. – P.425–432.
  37. Mosconi C., Colli S., Medini L. et al. Vitamin E influences the effects of fish oil on fatty acids and eicosanoid production in plasma and circulating cells in the rat // Biochem. Pharmacol. – 1988. – **37**. – P.3415–3421.

38. Nanji A.A., Griniuviene B., Yacoub L.K. et al. Heat-shock gene expression in alcoholic liver disease in the rat is related to the severity of liver injury and lipid peroxidation // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1995. – **210** (1). – P.12–19.
39. Peng J., Jones G.L., Watson K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements // *Free Rad. Biol. Med.* – 2000. – **28** (11). – P.1598–1606.
40. Powers S.K., Criswell D., Lawler J. et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle // *Amer. J. Physiol.* – 1994. – **266** (2. Pt 2.). – P. R375–R380.
41. Pronai L., Ichimori K., Saigusa Y., Nakazawa H. 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide alone enhances the spontaneous superoxide generation by primaquine // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1991. – **288**. – P.276–281.
42. Roberts A.M., Messina E.J., Kaley G. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) mediates hypoxic relaxation of bovine coronary artery strips // *Prostaglandins*. – 1981. – **21**. – P.555–569.
43. Ryter S.W., Tyrrell R. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Rad. Biol. Med.* – 2000. – **28** (2). – P.298–309.
44. Sanz M.J., Ferrandiz M.L., Cejudo M. et al. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress // *Xenobiotica*. – 1994. – **24** (7). – P. 689–699.
45. Sazontova T.G. Regularity of the modulation of cell antioxidative status in response of the activation of free radical oxidation // *Hypoxia Med. J.* – 2002. – **10** (1–2). – P.2–9.
46. Sazontova T.G., Tkatchouk E.N., Kolmykova S.N. et al. Comparative analysis of peroxidation and antioxidant enzyme activities in rats adapted to different regimes of normobaric hypoxia // *Ibid.* – 1994. – **2** (4). – P. 4–7.
47. Sazontova T.G., Anchishkina N.A., Zhukova A.G. et al. Increase in resistance of membrane structures in adaptation to changing oxygen Level // *Adaptation Biol. Med.* – 2007. – **5**. – P. 308–314.
48. Semenza G.L. Perspectives on oxygen sensing // *Cell*. – 1999. – **98**. – P.281–284.
49. Singh B., Sharma S.P., Goyal R. Evaluation of Geriforte, an herbal geriatric tonic, on antioxidant defense system in Wistar rats // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1994. – **717**. – P. 170–173.
50. Skulachev V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concept of programmed death of organelles, cells and organisms // *Mol. Aspectg. Med.* – 1999. – **20**. – P.139–184.
51. Spasic M.B., Saicic Z.S., Buzadzic B. et al. Effect of long term exposure to cold on the antioxidant defense system in the rat // *Free Rad. Biol. Med.* – 1993. – **15** (3). – P. 291–299.
52. Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction // *Ibid.* – 1997. – **22** (1–2). – P.269–285.
53. Thomas S., Lowe J.E., Hadjivassiliou V. et al. Use of the Comet assay to investigate the role of superoxide in glutathione-induced DNA damage // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1998. – **243** (1). – P.241–245.
54. Ungemach F.R. Plasma membrane damage of hepatocytes following lipid peroxidation: involvement of phospholipase A<sub>2</sub>. – In: *Free radicals liver injury. Proc. Int. Meet. (Turin<sup>2</sup>, June 27–29, 1985)*. – Oxford, Washington DC, 1985. – 127–134.
55. Van Wylen D.G.L. Effect of ischemic preconditioning on interstitial purine metabolite and lactate accumulation during myocardial ischemia // *Circulation*. – 1994. – **89**. – P.2283–2289.
56. Wiener C.M., Booth G., Semenza G.L. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1 // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1996. – **225**. – P.485–488.
57. Zolotarjova N., Ho C., Mellgren R.L. et al. Different sensitivities of native and oxidized forms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to intracellular proteinases // *Biochim. and Biophys. Acta*. – 1994. – **1192** (1) – P.125–131.
58. Zhukova A.G., Sazontova T.G. Heme oxygenase: function, regulation, biological role // *Hypoxia Med. J.* – 2004. – № 3–4. – P.30–43.
59. Zulueta J.J., Yu F.-S., Hertig I.A. Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: Role of an NAD(P)h oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane // *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1995. – **12**. – P.41–49.

*Моск. ун-т им. М.В. Ломоносова;*

*ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва;*

*ГУ НИИ КПП ПЗ СО РАМН, Новокузнецк*

*E-mail: arhipenko@fbm.msu.ru*