



00292703

03
31056

На правах рукописи



Стряпко Надежда Владимировна

АДАПТАЦИЯ К ГИПОКСИИ И ГИПЕРОКСИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ
ТОКСИКАНТОВ В НИЗКИХ ДОЗАХ: СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ
ОКИСЛЕНИЕ И КОМПОНЕНТЫ РЕДОКС-СИГНАЛИЗАЦИИ

14.03.03 – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2015

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Образовательном
Учреждении Высшего Образования «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Глазачев Олег Станиславович
доктор биологических наук, профессор Сазонтова Татьяна Геннадьевна

Официальные оппоненты:

Чижев Алексей Ярославович - заслуженный деятель науки РФ, профессор,
доктор медицинских наук, профессор кафедры судебной экологии ФГБОУ ВПО
«Российский университет дружбы народов»

Дудченко Александр Максимович - доктор медицинских наук, заведующий
лабораторией патологии внутриклеточных полиферментных систем ФГБНУ
«Научно-исследова- тологии»

Ведущая органи

ГБОУ ВПО
университет им
Федерации

инский
ийской

Защита состо
диссертационно
Сеченова Минз
С диссертацией
И.М. Сеченова
д.49 и на сайте

едании
м.И.М.
стр.2.
имени
оспект,

489251

Автореферат р

Ученый секре
доктор медиц

евнич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В настоящее время актуальным вопросом медицины и биологии является поиск
способов защиты организма от ухудшающейся экологической обстановки в
мегаполисах и промышленных зонах. Зафиксировано превышение фоновых уровней в
воде и других объектах среды многих химических веществ, среди которых
распространенными являются хром и бензол. К основным источникам их поступления
относят работу автотранспорта, газо- и нефтеперерабатывающих комплексов, добычу
хромовой руды [Боев В.М. и др., 2003]. Важным является изучение влияния
хронического действия токсических компонентов, поскольку даже малые их дозы при
многократном поступлении могут в относительно короткие сроки приводить к
нарушению функционирования систем организма. Несмотря на отсутствие конкретной
нозологической, это может проявляться в снижении функциональных характеристик:
физической выносливости, работоспособности и резистентности к повреждающим
факторам [Утенин В.В., 2002]. Диагностика и коррекция подобных состояний
затруднена, что делает своевременным и актуальным поиск их действенных способов.

Биотрансформация большинства ксенобиотиков осуществляется в системе
микросомального окисления в печени, что необходимо для выведения токсикантов из
организма [Kondrova E. et al., 2007]. Этот процесс сопровождается образованием
активных форм кислорода (АФК), как показано и для бензола [Тимошинова С.В. и др.,
2004; Ермолина Е.В. и др., 2012] при его окислении до гидрофильных метаболитов в
системе цитохром P450. Ионы St^{6+} трансформируются в присутствии восстановителей
глутатиона, аскорбата, НАДН [Myers C.R., 2012; O'Brien T.J. et al., 2013], что также
ведет к образованию одной из АФК - гидроксильного радикала и может повреждать
клеточные молекулы и структуры.

Патофизиологические механизмы острого отравления высокими дозами бензола
и хрома изучаются достаточно давно, однако практически отсутствуют работы по
многократному их поступлению в низких дозах, хотя именно эта проблема приобретает
все большую значимость в связи с неблагоприятной экологической обстановкой, а в
последнее время - при изучении влияния действия токсических веществ на организм
работников, занятых в нефтяной отрасли. Так, показано, что длительная экспозиция
низких доз бензола может приводить к значительному повышению риска развития
гемо- и лимфопролиферативных заболеваний [Divine B.J. and Hartman C. 2000; Lewis
R.J. et al., 2003; Kirkeleit J. et al., 2007]. Краткосрочное действие низких доз бензола
[Glass D.C. et al., 2003] также повышает риск возникновения заболеваний, в том числе
и онкологических. Поэтому актуальным является изучение, наряду с хроническим,

03
31056

1
19.06.15
for

489 251 489251

также и краткосрочного действия токсикантов в низких дозах и поиск способов повышения детоксикационных свойств организма в целом.

Учитывая трудности выявления патологических изменений при действии токсикантов в малых дозах и донозологический этап патогенеза таких состояний, мало эффективных методов их медикаментозной коррекции. Тем не менее, основываясь на показанной при их действии индукции АФК-зависимых процессов, эффективными могут быть немедикаментозные способы повышения неспецифической резистентности организма, в том числе к действию АФК. В организме индукция АФК, редокс-сигнализации и свободнорадикальных процессов протекает постоянно, благодаря чему в клетке при физиологических условиях реализуется ряд основных регуляторных функций, а также развивается клеточный ответ на действие стрессорных и гипоксических факторов. Основной принцип периодической адаптации к таким факторам, как немедикаментозного метода повышения устойчивости организма, реализуется при периодическом действии внешнего стимула за счет прерывистой ограниченной активации АФК и редокс-сигнализации с последующим синтезом протекторных систем. На этом основано формирование неспецифической компоненты повышения устойчивости организма при адаптации к физическим нагрузкам [Morton J.P. et al., 2009; Halliwell B., 2010], холоду [Spasic M.B. et al., 2011], стрессу [Пшенникова М.Г. и др., 2002], гипоксии [Arkhipenko Yu.V. et al., 1995; Sazontova T.G. et al., 2002].

В настоящее время успешно развивается направление адаптационной терапии и профилактики, в том числе, к периодической гипоксии, повышающей резистентность организма – интервальной нормобарической гипоксической тренировке, которая применяется в медицинской и спортивной практике [Стрелков Р.Б., Чижов А.Я., 2001]. В основе ее действия лежит как собственно адаптация к гипоксии, так и воздействия периодов реоксигенации в момент возвращения к дыханию воздухом с нормальным содержанием кислорода. Уровень кислорода в сеансах нормоксии при этом является относительно повышенным для организма, перенесшего действие гипоксии [Arkhipenko Yu.V. et al., 1997]; в момент реоксигенации в клетке происходит индукция АФК, что активирует каскад редокс-сигнального пути, направленный на формирование адаптационного ответа и повышение резистентности структур [Das D.K. 2003, 2010]. В эксперименте показано, что применение адаптации к интервальной гипоксии в течение 21 дня повышает резистентность мембран печени, сердца и коры головного мозга к действию АФК [Sazontova T.G. et al., 1994], что может лежать в основе перекрестных защитных эффектов данного вида адаптации, в том числе, на физическую выносливость организма и подтверждается положительными

результатами применения ее в спорте [Радзиевский П. А. 2001; Чижов А.Я., Потиевская В.И., 2002].

Продолжается поиск наиболее эффективных режимов гипоксических тренировок, а также возможности уменьшения продолжительности их курса, что обусловлено особенностью их применения в клинической и спортивной практике. Формирование защитного эффекта за более короткое время требует углубления гипоксии, что при реоксигенации усиливает АФК-сигнал, что, несмотря на значительный синтез защитных систем, не ограничивает высокой интенсивности АФК-процессов [Sazontova T.G. et al., 1994]. В лаборатории адаптационной медицины ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова разработан и в 2006 году запатентован новый способ адаптации к интервальному изменению уровню кислорода – к гипоксии-гипероксии – метод повышения неспецифической резистентности организма (патент на изобретение № 2289432 от 20.12.2006г). При этом усиление АФК-сигнала достигается путем замены периодов нормоксии периодами умеренной гипероксии, что позволяет избежать углубления гипоксической составляющей при более быстром формировании защитного эффекта от АФК-индуцированных повреждений [Сазонтова Т.Г. и Архипенко Ю.В., 2004]. Однако возможность стимуляции с помощью адаптации к гипоксии-гипероксии детоксикационных способностей организма не изучалась.

В работе после выбора оптимального режима введения гипероксической компоненты в адаптацию к изменению уровня кислорода на модели действия смеси бихромата калия и бензола, разработанной для изучения эффектов малых доз этих токсикантов на донозологическом этапе [Боев В.М. и др., 2003], оценена способность предварительной адаптации к изменению уровня кислорода компенсировать АФК-индуцированные нарушения при введении токсикантов в малых дозах; изучена возможность с помощью адаптации к гипоксии-гипероксии поддерживать функционирование организма на фоне уже существующего поступления токсикантов, при применении кратковременного режима адаптации, выбранного с целью минимизации количества сеансов для практического применения.

Цель исследования – оценка возможности реализации защитного потенциала адаптации к изменению уровня кислорода – к гипоксии-нормоксии и гипоксии-гипероксии при различной длительности действия токсикантов в малых дозах.

Задачи исследования:

1. Протестировать эффективность гипероксической компоненты в режимах многократных сеансов непрерывной гипероксии и интервальной гипоксии-гипероксии на параметры поведения, уровень свободнорадикального окисления и ферментов антиоксидантной защиты.

2. Оценить в комплексном исследовании влияние $K_2Cr_2O_7$ и бензола в малых дозах при различной длительности их введения на физическую выносливость, интенсивность АФК-зависимых процессов, уровень фактора транскрипции - NIF-1 α и индуцируемых им белков срочного ответа.

3. Изучить защитное действие предварительной адаптации к изменению уровня кислорода при введении токсикантов в малых дозах по способности компенсировать обусловленные ими изменения устойчивости к физическим нагрузкам, уровня свободнорадикального окисления и других компонентов редокс - сигнализации.

4. Установить возможность сохранения эффекта предварительной адаптации к изменению уровня кислорода в условиях увеличения длительности введения малых доз токсикантов и сравнить эффективность применения режимов адаптации к гипоксии-нормоксии и гипоксии-гипероксии.

5. Оценить возможность реализации защитного эффекта адаптации к гипоксии-гипероксии, примененной на фоне действия токсикантов в малых дозах и в условиях сокращения сроков адаптации на параметры поведения, физической выносливости, уровня свободнорадикального окисления и АФК-индуцибельных и конститутивных белков HSP.

Научная новизна

Впервые в ходе комплексного исследования выявлен повреждающий эффект введения малых доз бензола и бихромата калия на физическую выносливость, интенсивность свободнорадикальных процессов, активность ферментов антиоксидантной защиты, индуцибельных компонентов редокс-сигнальной системы – фактора транскрипции NIF-1 α и белков семейства HSP.

Впервые проведен сравнительный анализ возможности реализации защитного действия сеансов адаптации к гипероксии в непрерывном и интервальном режимах. В случае непрерывной гипероксии отмечен некомпенсированный уровень АФК-зависимых процессов, растет компонента тревожности поведения; адаптация к интервальной гипоксии и умеренной гипероксии повышает резистентность к свободнорадикальным процессам при поддержании баланса прооксидантов и антиоксидантов на контрольном уровне.

Впервые применена адаптация к изменению уровня кислорода в режимах гипоксии-нормоксии и гипоксии-гипероксии с целью повышения неспецифической устойчивости организма и предупреждения нарушений, вызванных применением смеси токсикантов в малых дозах. Оба вида адаптации позволяют восстановить сниженную при действии токсикантов физическую выносливость, предупреждают повышение уровня NIF-1 α и HOx-1. Адаптация к гипоксии-гипероксии имеет дополнительный защитный эффект, выражающийся в достоверном повышении

выносливости животных, нормализации уровня свободнорадикального окисления. Показана возможность сохранения защитного эффекта адаптации к гипоксии-гипероксии при увеличении длительности введения токсикантов.

Впервые новый метод адаптации к гипоксии-гипероксии применен на фоне уже существующего поступления токсикантов, а не в предварительном режиме, показана возможность сокращения сроков такой адаптации при сохранении ее эффективности в отношении повышения физической выносливости, снижении стрессорной компоненты поведения и нормализации уровня АФК-зависимых процессов.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе комплексного исследования при оценке изменений физической выносливости организма, параметров поведения, показателей свободнорадикального окисления, фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией - NIF-1 α и опосредованных его действием других компонентов редокс-сигнальной системы, показано защитное действие адаптации к изменению уровня кислорода от нарушений, вызванных введением токсикантов в низких дозах.

Сравнительный анализ эффекта адаптации к интервальной гипоксии-нормоксии и гипоксии-гипероксии позволил получить экспериментальное обоснование возможности расширения спектра применения адаптации к изменению уровня кислорода и использования ее при действии токсикантов в малых дозах и в целом для стимуляции детоксикационных свойств организма, предложены возможные режимы таких адаптирующих воздействий.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Проведение адаптации к непрерывной нормобарической гипероксии сопровождается снижением устойчивости к индукции свободнорадикальных процессов, повышением компоненты тревожности поведения животных. Интервальная адаптация к гипоксии и умеренной гипероксии, напротив, позволяет достичь устойчивого антистрессорного защитного эффекта.

2. Применение смеси токсикантов приводит к снижению физической выносливости, инициации свободнорадикальных процессов, активации фактора NIF-1 α и изменению уровня других компонентов внутриклеточной редокс-сигнализации - ферментов антиоксидантной защиты и индуцибельных форм HSPs.

3. Предварительная адаптация к изменению уровня кислорода в режимах гипоксии-нормоксии и гипоксии-гипероксии поддерживает контрольный уровень резистентности к физическим нагрузкам, компенсирует повышение уровня компонентов редокс-сигнализации, вызванное введением токсикантов. Адаптация к гипоксии-гипероксии характеризуется большей эффективностью, приводя к

достоверному повышению физической выносливости, полной компенсации свободнорадикальных процессов.

4. Защитный эффект предварительной адаптации к гипоксии-гипероксии, но не гипоксии-нормоксии сохраняется при увеличении длительности введения токсикантов: повышена устойчивость к острым физическим нагрузкам, скомпенсирован уровень фактора HIF-1 α , белков семейства HSP.

5. При усложнении условий проведения адаптации к гипоксии-гипероксии - кратковременным курсом и на фоне введения токсикантов, показан защитный эффект, проявляющийся в повышении физической выносливости, поддержании поведенческого статуса, в том числе, компоненты тревожности на контрольном уровне, а также компенсации АФК-зависимых процессов, уровня индуцибельных и конститутивных форм белков срочного ответа семейства HSP.

Личный вклад

Автором проведена комплексная экспериментальная работа по сравнению эффективности адаптации к изменению уровня кислорода: гипоксии-нормоксии и гипоксии-гипероксии от нарушений, возникающих при действии токсикантов в малых дозах. Их оценка проведена при применении адаптации предварительно или на фоне действия токсикантов на основе всего объема патофизиологических, биохимических и биофизических исследований, представленных в работе. Проанализировано значительное число русских и зарубежных литературных источников по изучаемой проблеме, статистически обработаны полученные результаты и сформулированы выводы. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

Апробация работы и публикации по теме диссертации

Апробация работы проведена 15 мая 2014 года на совместном заседании лаборатории адаптационной медицины и кафедры физиологии и общей патологии Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Экспертная оценка работы дана на учебно-методической конференции кафедры патологической физиологии лечебного факультета Первого МГМУ имени И.М. Сеченова 15.05.2014г. Основные положения работы доложены и обсуждены на VI Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофизической медицины» (Киев, 2009), VI Всероссийской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2011), XVI Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей с международным участием «Фундаментальная наука и клиническая медицина - Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2013), X Anniversary Ukrainian - Polish - Belorussian Conference "Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications" (Kiev, 2013), Научно-практической конференции с международным участием «Реабилитация и

профилактика -2013» (Москва, 2013). По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 5 в журналах, рецензируемых ВАК РФ.

Соответствие паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.03.03 - Патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно - пункту 1 и 10 паспорта специальности «Патологическая физиология».

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 151 странице и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, выводов. Список цитируемой литературы состоит из 201 источника, из них 126 на английском языке. Диссертация иллюстрирована 47 рисунками, 7 таблицами и 3 схемами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 168 крысах самцах Вистар массой 280-320г. Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», 2012. Животных содержали в стандартных условиях вивария, каждая группа $n=7$ содержалась в отдельной клетке. Животных лишали корма за сутки до острого воздействия или забора тканей. В начале эксперимента и перед забором биоматериала фиксировали вес животных, в качестве наркоза использовался уретан.

Патофизиологические и физиологические модели

1. Модели острых воздействий:

- острая физическая нагрузка (ОФН) до истощения, включающая стрессорную компоненту, с помощью принудительного плавания до отказа с 5% грузом от массы тела при температуре воды 21°C;

- введение малых доз токсикантов в концентрации в несколько раз ниже LD₅₀ (животные постоянно в течение одной (Б1+ОФН) или двух (Б2+ОФН) недель получали с питьевой водой смесь 0,12 мл/кг бензола и 5,0 мг/кг бихромата калия.

2. Модели адаптации к изменению уровня кислорода - в нормобарических условиях с помощью оригинальной установки, работающей по принципу мембранного деления газов - совместная разработка лаборатории адаптационной медицины ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова и фирмы «Метакс»:

- адаптация к непрерывной гипероксии (13 O₂) - 40% O₂, 13 дней, 1 час в день;

- классическая адаптация к гипоксии и нормоксии (Г/Н) - чередование 5 мин смеси с 10% O₂ и 3 мин нормоксии, по 64 мин ежедневно, 14 сеансов (Г/Н+Б1+ОФН и Г/Н+Б2+ОФН);

- адаптация к гипоксии - гипероксии (Г/Г) - чередования периодов гипоксии - 5 мин 10% O₂ и умеренной гипероксии - 3 мин 30% O₂, по 64 мин курсом 9 дней (9Б+Г/Г+3ОФН) или 14 дней (Г/Г+Б1+ОФН и Г/Г+Б2+ОФН).

Тестирование функционального состояния:

- использовали поведенческие тесты - «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «открытое поле» (ОП) для определения двигательного-ориентировочного активности и компоненты тревожности животных по показателям: общего пробега; средней и максимальной скорости движения; времени проведенном в открытых, закрытых лучах и в центре лабиринта; количеству выходов и взглядов на открытые лучи; общего количества стоек и времени груминга; общего времени движения и неподвижности; эпизодов движения и неподвижности; количества стоек на открытых лучах и свешиваний с открытых лучей.

- регистрировали время удержания животных на воде при острой истощающей физической нагрузке, изменение веса животных, объема потребляемой жидкости с токсикантами в динамике эксперимента.

Свободнорадикальное окисление и активность ферментов антиоксидантной защиты

Активацию свободнорадикального окисления проводили в ткани печени с помощью его индукции в системе аскорбат (0,05-0,4 ммоль) или Fe²⁺ +аскорбат с параллельным контролем на автоокисление. Отбор проб на определение концентрации продуктов, реагирующих с тиобарбитуратом, проводили после добавления индуктора и через фиксированные временные интервалы в динамике окисления. После этого смесь инкубировали при 93°C, с последующим центрифугированием при 1400 g в течение 10 мин и регистрацией оптической плотности по максимуму спектра поглощения.

Активность каталазы оценивали по потреблению H₂O₂ при 240 нм [Luck H., 1953], супероксиддисмутазы [Fridovich I., 2011] - по степени ингибирования образования супероксидного анион радикала в системе ксантин - ксантиноксидаза при 560 нм и глутатионредуктазы по потреблению НАДФН [Dickinson D. A., 2002] при 340 нм, на спектрофотометре Cintra 10e GBC.

Western-blot-анализ

Проводили Western-blot-анализ для регистрации уровня HIF-1α, индуцибельных и конститутивных форм белков семейства HSP в разных тканях. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с рекомендациями Bio-Rad с последующим определением количества белка в пробе по амплитуде четвертой производной спектра оптической плотности в области 240-320 нм на спектрофотометре Cintra 10e GBC. Для HIF-1α использовали 8% разделяющий гель, для белков семейства HSP - 10% разделяющий гель. Проводили электрофорез в электродном буфере 30 мин при 100В -

до достижения белками границы между концентрирующим и разделяющим гелями, затем при 200В - 25-45 мин. После этого осуществляли перенос белков с геля на мембрану в системе для проведения блоттинга Semidry при напряжении 12В в течение 35-55 минут в зависимости от типа белка. Хранение мембран осуществляли при 4°C. Для хемилюминесцентной детекции использовали первые моноклональные антитела к белкам (Stressgen, Канада; SantaCruz, США) (1:1000) и вторые антитела, конъюгированные с пероксидазной меткой (Jackson Immuno Research) (1:2000). После детекции и проявки оценку результатов проводили в программе TotalLab, выражали в относительных денситометрических единицах.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы STATISTICA 10.0 согласно рекомендациям по биомедицинской статистике [Платонов А.Е., 2000]. Сравнение выборок проводили, включая методы непараметрического анализа - U Test Mann-Whitney. Результаты на графиках и в таблицах представлены в виде медианы (10й - 90й процентиля), кроме случаев оговоренных отдельно. Различия между выборками считались достоверными при p≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Тестирование гипероксической компоненты в адаптации к изменению уровня кислорода

1.1 Эффект адаптации к сеансам непрерывной гипероксии

При адаптации к многократным сеансам непрерывной гипероксии отмечено достоверное отсутствие прибавки веса животных, получавших курс из 13 ингаляций кислородной смесью (13 O₂), по сравнению с контрольной группой - 19% (p≤0,05). Такое непрерывное многократное воздействие, несмотря на низкое содержание кислорода в газовой смеси приводило также к достоверному повышению интенсивности свободнорадикальных процессов и компенсаторной активации ферментов антиоксидантной защиты в печени (Рис.1А,Б), росту уровня индуцибельных защитных белков - HOx-1 и HSP70, что свидетельствует о наличии стрессорной компоненты такого воздействия.

Это подтверждается и при оценке поведенческих параметров в тесте ПКЛ. После тренировки к непрерывной гипероксии - 13O₂, по сравнению с контролем, достоверно увеличен общий пробег и средняя скорость движения - в 1,5 и 1,7 раза (p<0,05) (Рис. 1В, Г), увеличено время, проведенное на открытых лучах (в 3,5 раза, p<0,05) и в центре лабиринта (в 4,5 раза, p<0,05), а также количества взглядов и выходов на открытые

лучи, что в целом свидетельствует о высоком уровне компоненты тревожности поведения.

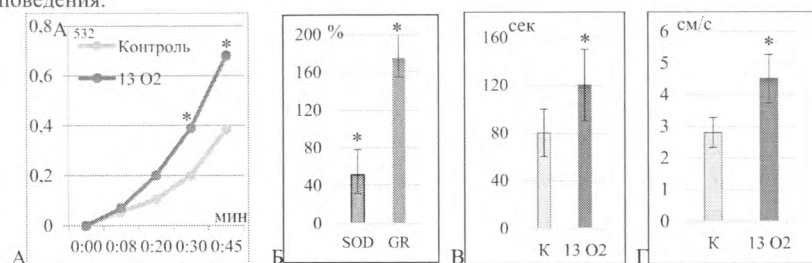


Рис.1 Эффект адаптации к сеансам непрерывной гипероксии на уровень свободнорадикального окисления, ферментов антиоксидантной защиты и параметры поведения. **А)** Динамика накопления ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления в печени при его индукции *in vitro* в системе с аскорбатом. A_{532} - оптическая плотность при 532 нм; * - достоверность отличий ($p \leq 0.05$) от контроля (Mann-Whitney U Test). **Б)** Активность супероксиддисмутазы - SOD и глутатионредуктазы - GR, в процентах от контроля **В)** Общий пробег. **Г)** Средняя скорость движения. К - контроль; 13 O₂ - сеансы непрерывной гипероксии. Данные представлены в виде Me (10p-90p).

Поэтому в дальнейшем интенсивность гипероксической компоненты была уменьшена за счет снижения концентрации уровня кислорода и применения ее в интервальном режиме, предполагающем чередование интервалов гипоксии и умеренной гипероксии в течение сеанса адаптации.

1.2 Эффект адаптации к интервальной гипоксии-гипероксии

Адаптация к интервальной гипоксии-гипероксии (Г/Г), в отличие от режима повторяющихся сеансов непрерывной гипероксии, повышает устойчивость ткани печени - интенсивность свободнорадикальных процессов не увеличивается, а, напротив, снижается от контроля (Рис. 2А).

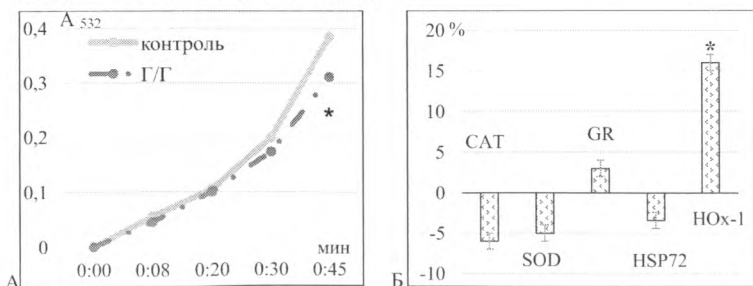


Рис.2 Эффект адаптации к гипоксии-гипероксии на уровень свободнорадикального окисления, антиоксидантных ферментов и защитных белков. **А)** Динамика накопления ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* в печени. A_{532} - оптическая плотность при 532 нм; К - контроль, Г/Г - адаптация к гипоксии-гипероксии. **Б)** Активность каталазы - CAT, супероксиддисмутазы - SOD, глутатионредуктазы - GR, индуцибельных HSP72 и гемоксигеназы - HOx-1 в печени в процентах от контрольной группы. * - достоверность отличий ($p \leq 0.05$) от контроля (Mann-Whitney U Test).

Действительно, через 45 мин индукции окисления скорость накопления ТБК-активных продуктов снижена на 19% ($p \leq 0.05$) от контроля, на фоне отсутствия активации ферментов антиоксидантной защиты и стресс-белка HSP72 (Рис.2). Такое соотношение между прооксидантами и антиоксидантами в целом свидетельствует о компенсации АФК-сигнала. Это подтверждается и при оценке параметров поведения в тесте «открытое поле», где отмечалось увеличение двигательной активности и снижение компоненты тревожности. Следовательно, уже к 14 сеансам адаптации к Г/Г формируется устойчивость к индукции свободнорадикального сигнала, что значительно раньше, чем зарегистрировано [Zhukova A.G., Sazontova T.G., 2004] при классической адаптации к гипоксии-нормоксии, при которой стадия долговременной адаптации достигается через 3-4 недели тренировки.

Таким образом, многократно повторяющаяся непрерывная гипероксия с умеренным содержанием кислорода индуцирует свободнорадикальное окисление и значительно повышает компоненту тревожности поведения. Курс интервальной адаптации к гипоксии и умеренной гипероксии позволяет повысить устойчивость к индукции свободнорадикального окисления и поддержать баланс прооксидантов и защитных белков срочного ответа на контрольном уровне.

Поэтому в основной части работы для изучения возможности предупреждения АФК-индуцированных нарушений при введении токсикантов в низких дозах с помощью предварительной адаптации к изменению уровня кислорода протестирован режим интервальной гипоксии-гипероксии и проведено его сравнение с классическим режимом гипоксической тренировки к гипоксии-нормоксии.

2. Эффект предварительной адаптации в условиях применения токсикантов

2.1 Эффект адаптации к изменению уровня кислорода в условиях применения токсикантов в малых дозах

На первом этапе проводилось изучение эффекта предварительной адаптации в условиях применения токсикантов в малых дозах в течение недели. Несмотря на то, что дозы токсикантов были значительно ниже LD₅₀, в первые три дня после начала добавления смеси токсикантов в воду, в группе Б1+ОФН, отмечалось достоверное двух-кратное снижение объема потребляемой жидкости от контроля (Рис.3А), с последующим восстановлением питьевого режима.

Отмечена также задержка роста животных, получавших токсиканты. В группе с введением токсикантов в малых дозах - Б1+ОФН - не выявлено достоверного повышения веса животных, в отличие от группы ОФН, где прибавка в весе к концу эксперимента составляла до 17% ($p \leq 0.05$). Кроме того, в группе Б1+ОФН наблюдалось снижение выносливости животных: время удержания на воде после недели введения

токсикантов - Б1+ОФН достоверно снижено ($p \leq 0,05$), относительно ОФН без токсикантов (Рис.3Б).

Предварительная адаптация к изменению уровня кислорода в обоих режимах - к Г/Н и к Г/Г - предупреждала как задержку роста животных, так и снижение длительности удержания на воде (Рис.3Б). При этом в случае предварительной адаптации к Г/Н происходило восстановление выносливости до уровня контрольных животных, не получавших токсиканты - группа ОФН, а при адаптации к Г/Г ее достоверное повышение, что выражалось в достоверном увеличении длительности удержания на воде - в группе Г/Г+Б1+ОФН на треть выше, чем в группе Б1+ОФН.

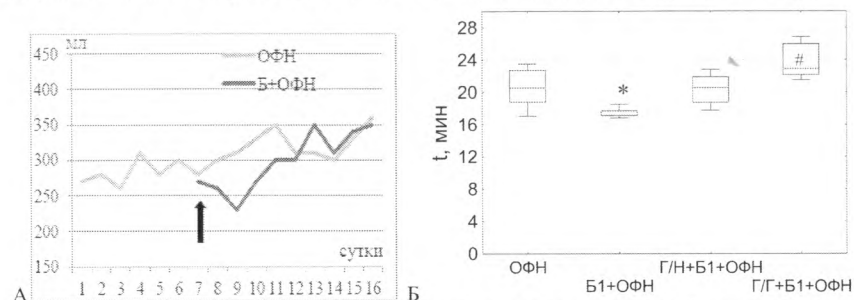


Рис.3 Эффект введения токсикантов и предварительной адаптации к изменению уровня кислорода. А) Объем потребляемой жидкости в среднем в сутки на группу. Стрелкой отмечен первый день добавления токсикантов. Б) Влияние предварительной адаптации к изменению уровня кислорода на физическую выносливость в условиях применения токсикантов. Представлена диаграмма типа Boxplot, нижняя и верхняя границы столбиков - 25 и 75 квартили соответственно, горизонтальная линия - медиана, нижняя и верхняя планки погрешностей - минимум и максимум соответственно. ОФН - острая физическая нагрузка; Б1+ОФН - смесь токсикантов в течение недели с последующей ОФН; предварительная адаптация к гипоксии-нормоксии - Г/Н+Б1+ОФН или к гипоксии-гипероксии - Г/Г+Б1+ОФН в течение двух недель, токсиканты с 7 дня в течение недели с последующей ОФН. * - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) от контроля, # - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) от группы Б1+ОФН (Mann-Whitney U Test).

После проведения ОФН скорость накопления продуктов свободнорадикального окисления в печени превышает контрольный уровень (Таблица 1), что сопровождается достоверной активацией SOD (Рис.4). ОФН, проведенная на фоне потребления токсикантов в малых дозах в течение недели, вызывала еще большее снижение устойчивости мембранных структур - уровень продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* в группе Б1+ОФН увеличен, относительно ОФН (Таблица 1). Добавление малых доз токсикантов - Б1+ОФН еще больше активировало ферменты антиоксидантной защиты - достоверный рост отмечен для уровня SOD и Cat, как по сравнению с контролем, так и с ОФН (Рис.4).

Предварительная адаптация к Г/Г предупреждала повышение интенсивности окислительных процессов, вызванное введением токсикантов - группа Г/Г+Б1+ОФН по сравнению с Б1+ОФН (Таблица 1), что сопровождалось высоким уровнем защитных систем (Рис.4). Адаптация к Г/Н данным эффектом не обладала, напротив, на фоне

действия токсикантов - Г/Н+Б1+ОФН, росла чувствительность клеточных мембран к индукции свободнорадикальных процессов на фоне отсутствия активации антиоксидантных ферментативных систем (Рис.4).

Таблица 1. Динамика накопления ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro*.

	10мин	20мин	30мин
Контроль	0,037 (0,034-0,039)	0,041 (0,035-0,052)	0,050 (0,042-0,062)
ОФН	0,041 (0,037-0,052)	0,043 (0,032-0,055)	0,138* (0,061-0,215)
Б1+ОФН	0,052 (0,051-0,068)	0,074 (0,061-0,081)	0,215* (0,205-0,248)
Г/Н+Б1+ОФН	0,058 (0,051-0,065)	0,221* (0,019-0,038)	0,420* (0,340-0,482)
Г/Г+Б1+ОФН	0,045 (0,038-0,049)	0,046 (0,039-0,054)	0,062 (0,061-0,067)

Примечание: * - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) от контроля (Mann-Whitney U Test), данные представлены в виде Me (10p-90p). Обозначения групп см. Рис.3.

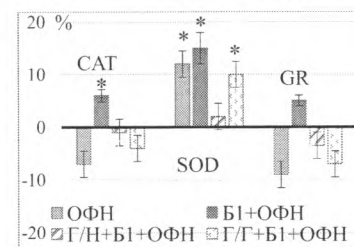


Рис.4 Эффект адаптации к изменению уровня кислорода на уровень ферментов антиоксидантной защиты в печени. Изменение активности каталазы - Cat, супероксиддисмутазы - SOD, глутатионредуктазы - GR, в процентах от контроля, принятого за нулевой уровень, * - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) от контроля (Mann-Whitney U Test). Обозначения групп см. Рис.3.

Уровень фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией - HIF-1 α повышен в сердце при действии ОФН и в еще большей степени при проведении ОФН на фоне токсикантов - группа Б1+ОФН (Рис.5А), что отражает углубление гипоксической компоненты при ОФН и в большей степени - при ОФН на фоне введения токсикантов.

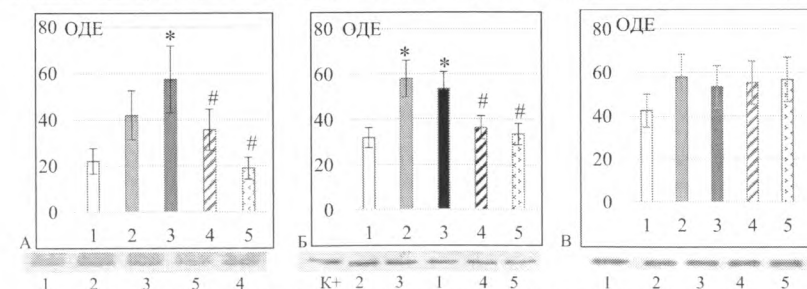


Рис.5 Эффект адаптации к изменению уровня кислорода при введении токсикантов в течение одной недели на уровень HIF-1 α (А), HOx-1 (Б) и HSP72 (В) в сердце. Внизу - пример оригинальных фотографий иммуноблотов, на которых номер пятна соответствует номеру группы. Контроль (1); ОФН (2); Б1+ОФН (3); Г/Н+Б1+ОФН (4); Г/Г+Б1+ОФН (5). К+ - положительный контроль. Достоверность отличий ($p \leq 0,05$) от Контроля (*) и Б1+ОФН (#) (Mann-Whitney U Test). Обозначения - см. Рис.3.

Аналогичные изменения зарегистрированы для регулируемой этим фактором индуцибельной формы гемоксигеназы - HOx-1 в сердце (Рис. 5Б). Защитный эффект адаптации к изменению уровня кислорода в обоих режимах - Г/Н и Г/Г, проявлялся в компенсации повышенного при введении токсикантов уровня фактора транскрипции HIF-1α (Рис.5А) и индуцибельной формы HOx-1 (Рис.5Б). Этого не происходило со стресс-белком - индуцибельной HSP72 - в условиях введения токсикантов оба вида адаптации не снижали его уровень (Рис.5В).

Таким образом, краткосрочное введение токсикантов в малых дозах приводит к замедлению роста, к уменьшению объема потребляемой жидкости, снижению выносливости животных, повышению интенсивности свободнорадикального окисления в печени и активности антиоксидантных ферментов, повышению уровня фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией - HIF-1α и индуцибельного защитного белка HOx-1.

Оба вида предварительной адаптации к изменению уровня кислорода - классическая Г/Н и новый вид - Г/Г, в условиях действия токсикантов в малых дозах предупреждают вызванное ими снижение выносливости животных, задержку роста, компенсируют повышенный уровень HIF-1α и снижают уровень индуцибельного белка HSP32.

Новый метод адаптации к Г/Г, в отличие от Г/Н, в условиях предварительного применения обладает дополнительным положительным действием, что выражается в достоверном повышении выносливости животных, несмотря на введение токсикантов, и полной компенсации свободнорадикальных процессов.

2.2 Эффект предварительной адаптации в условиях увеличения длительности применения токсикантов

Увеличение длительности введения токсикантов до двух недель - Б2+ОФН - не приводит к существенным различиям в весе животных, общее время удержания на воде достоверно не отличается от группы контрольных животных с тестом ОФН. При этом еще больше снижается устойчивость ткани печени к индукции свободнорадикального окисления. Скорость накопления ТБК-активных продуктов в группе Б2+ОФН повышена по сравнению с группой Б1+ОФН, компенсаторно продолжает увеличиваться активность защитных ферментов (Таблица 2). Потребление животными токсикантов в течение одной недели повышает уровень HIF-1α в сердце (Рис.6), что подтверждает наличие высокой гипоксической компоненты воздействия, и индуцирует белки семейства HSP.

Однако, увеличение длительности введения токсикантов до двух недель не сопровождалось дальнейшей активацией HIF-1α в сердце в группе Б2+ОФН относительно Б1+ОФН (Рис.6), что может свидетельствовать об истощении данной системы в связи с повышением АФК-сигнала и необходимостью поддержания синтеза

защитных белков, несмотря на малые дозы применяемых токсикантов. Важно, что аналогичная закономерность прослеживается и для SOD (Рис.4), которая так же, как и модулирующий её активность HIF-1α, одной из первых реагирует на АФК-сигнал. Так, при увеличении длительности введения токсикантов до двух недель уровень каталазы при Б2+ОФН достоверно возрастает от контроля и Б1+ОФН, тогда как дополнительная активация SOD в группе Б2+ОФН отсутствует (Таблица 2). На данном сроке введения токсикантов - Б2+ОФН - существенно растет уровень стресс-белка HSP72, чего не наблюдалось при Б1+ОФН (Рис. 5В). Это свидетельствует об усилении стрессорной компоненты в результате увеличения длительности введения токсикантов. Кроме того, учитывая отсутствие дополнительной активации транскрипционного фактора HIF-1α (Рис.6) и SOD (Таблица 2) можно говорить о возможном истощении защитных ресурсов.

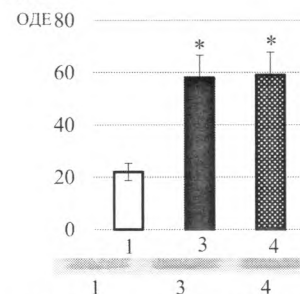


Рис.6 Изменение уровня HIF-1α при введении токсикантов в малых дозах. Внизу - пример оригинальной фотографии иммуноблота, подписи пятен соответствуют подписям групп. ОДЕ-относительные денситометрические единицы. Контроль (1); Б1+ОФН (3); Б2+ОФН (4). * - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U Test).

Таблица 2. Динамика накопления ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* и уровень ферментов антиоксидантной защиты при увеличении длительности введения токсикантов.

		Контроль	ОФН	Б2+ОФН	Г/Н+Б2+ОФН	Г/Г+Б2+ОФН
Индукция свободно-радикального окисления, A_{532}	10 мин	0,037 (0,034-0,039)	0,041 (0,037-0,05)	0,074 (0,048-0,102)	0,152 (0,048-0,351)	0,165 (0,098-0,190)
	20 мин	0,041 (0,035-0,052)	0,043 (0,032-0,055)	0,151* (0,089-0,223)	0,252* (0,190-0,321)	0,211* (0,171-0,342)
	30 мин	0,050 (0,042-0,062)	0,138* (0,061-0,215)	0,331* (0,225-0,582)	0,423* (0,273-0,460)	0,381* (0,220-0,434)
Активность антиоксидантных ферментов	CAT	1,77 (1,68-1,84)	1,65 (1,55-1,74)	2,23* (1,61-2,83)	1,90 (1,68-3,63)	1,61 (1,52-3,0)
	SOD	1,74 (1,6-1,9)	1,94 (1,63-2,0)	2,16* (1,82-2,51)	1,91 (1,70-2,8)	2,07* (2,0-2,6)
	GR	0,14 (0,13-0,15)	0,128 (0,101-0,155)	0,13 (0,126-0,143)	0,14 (0,12-0,17)	0,13 (0,12-0,14)

Примечание: A_{532} - оптическая плотность при 532 нм, CAT - каталаза, $\mu\text{моль} \times 10^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ в мин на мг белка, GR - глутатионредуктаза, $\mu\text{моль NADPH}$ в мин на мг белка, SOD - супероксиддисмутаза, у.е. * - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем (Mann-Whitney U Test).

Применение классической адаптации к Г/Н при двух недельном введении токсикантов, как и при введении их в течение одной недели, не нормализует повышенную в результате их действия чувствительность мембран печени к индукции АФК-зависимых процессов, более того, она увеличивалась, по сравнению с группой без адаптации - Б2+ОФН, при отсутствии повышения активности SOD и других ферментов антиоксидантной защиты, что в целом свидетельствует о декомпенсационном характере активации свободнорадикальных процессов (Таблица 2). В отличие от адаптации к Г/Н, предварительная адаптация к Г/Г при увеличении длительности введения токсикантов продолжает поддерживать высокую активацию SOD. Важно, что подобную закономерность стабильности активации SOD при увеличении длительности действия токсикантов мы видим, как при адаптации к Г/Г так и без нее. Поскольку адаптация к Г/Г достоверно активировала SOD (Таблица 2), это свидетельствует о большей, чем при Г/Н, стабильности синтеза защитных белков.

При увеличении длительности действия токсикантов адаптация к Г/Г, но не к Г/Н, вела к снижению повышенного высокого уровня HIF-1 α и индуцируемых им белков (Рис.7). При сравнении уровня HIF-1 α в группах с разной длительностью введения токсикантов показано, что защитный эффект адаптации к гипоксии-гипероксии сохраняется при увеличении длительности действия токсикантов. Так, в группе Г/Г+Б1+ОФН уровень HIF-1 α снизился на 38% по сравнению с группой Б1+ОФН, а Г/Г+Б2+ОФН – на 26% относительно Б2+ОФН. Таким образом, именно адаптация к Г/Г позволила компенсировать действие смеси бензола и бихромата калия, что проявилось и в функциональном тесте на выносливость (Рис. 8).

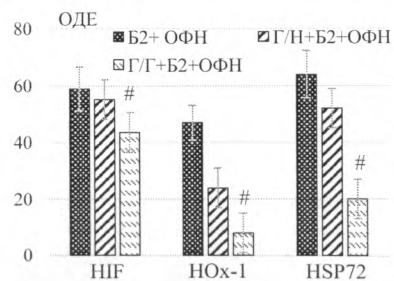


Рис.7 Эффект предварительной адаптации к изменению уровня кислорода на уровень белков срочного ответа. Изменение уровня HIF-1 α в сердце, NOx-1 и HSP72 в печени при введении токсикантов в малых дозах в течение двух недель, ОДЕ. # - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) от группы Б2+ОФН (Mann-Whitney U Test). Б2+ОФН – смесь токсикантов в течение двух недель с последующей ОФН; предварительная адаптация к гипоксии-нормоксии - Г/Г+Б2+ОФН или к гипоксии-гипероксии - Г/Г+Б1+ОФН в течение двух недель, токсиканты с 7 дня в течение двух недель с последующей ОФН.

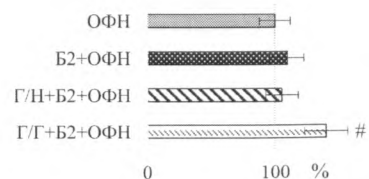


Рис.8 Эффект предварительной адаптации к изменению уровня кислорода в условиях различной длительности введения токсикантов. Представлена медиана значения времени удержания животных на воде в процентах относительно группы ОФН. Обозначения групп см. Рис.7 # - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) от группы Б2+ОФН (Mann-Whitney U Test).

Так же, как и при одной неделе введения токсикантов, защитный эффект адаптации к Г/Г по предупреждению снижения выносливости животных сохранялся и

при увеличении длительности введения токсикантов (Рис. 8). При действии токсикантов длительность удержания на воде достоверно на 30% выше при адаптации к гипоксии-гипероксии - Г/Г+Б2+ОФН, чем без нее - Б2+ОФН. Адаптация к гипоксии-нормоксии данным эффектом не обладала.

Таким образом, **предварительная адаптация к гипоксии-гипероксии, но не к гипоксии-нормоксии, предупреждает при увеличении длительности введения токсикантов, индуцированные ими нарушения, что выражалось в отсутствии задержки роста животных, повышении выносливости и компенсации повышенного уровня фактора транскрипции HIF-1 α и инициируемых им белков семейства HSP.**

3. Эффект кратковременной адаптации к гипоксии-гипероксии на фоне применения токсикантов в малых дозах

В заключительной части работы условия применения адаптации были усложнены. Адаптация к Г/Г проводилась не в предварительном, а в профилактическом режиме, а применялась совместно с действием токсикантов. Кроме того, длительность самой адаптации также была сокращена с 14 до 9 сеансов, т.е. тестировался кратковременный режим ее применения без предварительной индукции защитных систем.

3.1 Выбор тестирующей системы для выявления действия токсикантов

Для выявления защитных эффектов кратковременной адаптации на фоне введения токсикантов, которое сопровождается индукцией АФК-процессов, выбрана тест-система с трехкратной ОФН, обладающая меньшим повреждающим эффектом, чем однократная ОФН. Это выражалось в нормализации интенсивности свободнорадикального окисления, большей активации ферментов антиоксидантной защиты при 3ОФН, по сравнению с 1ОФН, нормализации уровня индуцибельной формы NOx-1 и конститутивной HSC73 в печени и скелетной мышце, а также повышении выносливости животных, что регистрировали по увеличению длительности удержания на воде при 3ОФН на 27% ($p < 0,05$) относительно 1ОФН.

При оценке параметров двигательной-ориентировочной активности животных в тесте «открытое поле» достоверных различий между однократной и трехкратной ОФН не выявлено, в стрессорных условиях теста ПКЛ отмечено достоверное повышение ее уровня в группе 3ОФН относительно 1ОФН (Рис.9). Одновременно показатели тревожности в группе 3 ОФН - общее время неподвижности, количество выходов и выходов на открытые лучи, стоек и свешиваний с них, общее время груминга - достоверно не изменялись, что в целом свидетельствует о снижении стрессорной компоненты.

Таким образом, при 3ОФН относительно 1ОФН происходило снижение уровня свободнорадикального окисления на фоне активации ферментов антиоксидантной защиты, повышение двигательной-ориентировочной активности, при отсутствии

усиления компоненты тревожности, что в целом является показателем менее стрессорного воздействия.

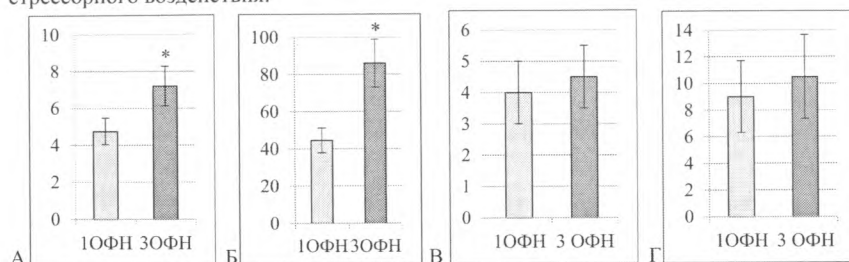


Рис.9 Оценка двигательной-ориентировочной активности. В тестах - ПКЛ: А) максимальная скорость движения (см/сек) Б) общее время движения (сек); и «Открытое поле»: В) количество заглядываний в норки, Г) количество стоек. 1 ОФН - однократная и 3 ОФН - трехкратная истощающая физическая нагрузка плаванием.

Поэтому в дальнейшей работе в качестве теста применялась менее интенсивное воздействие - 3ОФН - для выявления эффектов низких доз токсикантов и возможности коррекции выявленных нарушений с помощью адаптации к гипоксии-гипероксии.

3.2 Оценка эффекта кратковременной адаптации к гипоксии-гипероксии на фоне применения токсикантов.

На фоне приема смеси токсикантов - в группе 9Б+3ОФН относительно группы 3ОФН - снижалась выносливость животных, что выражалось в достоверном уменьшении длительности удержания на воде, активировалось свободнорадикальное окисление, несмотря на значительную индукцию защитных белков (Рис.10).

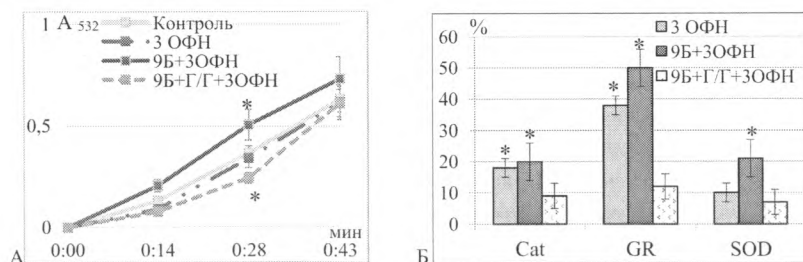


Рис.10 Эффект кратковременной адаптации к гипоксии-гипероксии на фоне введения токсикантов на уровень свободнорадикального окисления и ферментов антиоксидантной защиты в печени. А) Динамика накопления ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления при его индукции in vitro в печени. А₅₃₂- оптическая плотность при 532 нм; * - достоверность отличий ($p < 0,05$) от контроля (Mann-Whitney U Test). Б) Активность ферментов антиоксидантной защиты - каталазы - Cat, супероксиддисмутазы - SOD, глутатионредуктазы - GR в % от контроля, принятого за нулевой уровень. * - достоверность отличий ($p < 0,05$) от контроля (Mann-Whitney U Test).

Кратковременная в течение девяти дней адаптация к интервальной гипоксии-гипероксии, проводимая на фоне введения токсикантов, полностью компенсировала их

повреждающее действие и снижала интенсивность АФК-зависимых процессов. Оценка уровня ферментов антиоксидантной защиты подтверждает этот результат - их активность также возвращена к контрольному уровню (Рис.10Б).

При оценке уровня белков срочного ответа оказалось, что кратковременная адаптация к Г/Г не компенсировала повышенную при введении токсикантов гипоксическую компоненту. В печени уровни индуцибельной HSP32 и конститутивной HSC73 в группе адаптации на фоне введения токсикантов не изменялись по сравнению с группой 9Б+3ОФН (Таблица 3). Возможно, более медленная реакция печени объясняется тем, что на данном органе лежит основная нагрузка по элиминации токсических веществ и при кратковременной адаптации сохраняется необходимость поддержания высокого уровня синтеза защитных систем.

Таблица 3. Уровень индуцибельных и конститутивных форм белков семейства HSP (относительные денситометрические единицы).

Серия	Печень			Скелетная мышца		
	HSP32	HSP 72	HSC 73	HSP32	HSP 34	HSC 73
9Б+3ОФН	14,9 (13,2-15,5)	9,1 (8,8-9,6)	8,1 (7,6-8,6)	8,7 (8,2-8,9)	3,2 (2,9-3,4)	10,5 (9,9-10,8)
9Б+Г/Г+3 ОФН	19,8 (18,7-20,2)	9,5 (8,4-9,7)	8,7 (8,2-9,0)	4,5* (4,1-4,9)	2,8 (2,2-3,1)	8,3* (8,0-8,6)

Примечание: данные представлены в виде Me (10p-90p). * - достоверность отличий ($p < 0,05$) от 9Б+3ОФН (Mann-Whitney U Test).

При этом в скелетной мышце даже кратковременная в течение девяти дней адаптация к Г/Г приводила к снижению уровня индуцибельных и конститутивных форм стресс-белков (Таблица 3), что сопровождалось повышением устойчивости к физическим нагрузкам и подтвердилось в тесте на выносливость. Адаптация к Г/Г приводила к достоверному повышению физической выносливости по отношению к группе животных получавших токсиканты, но без адаптации (Рис.11).

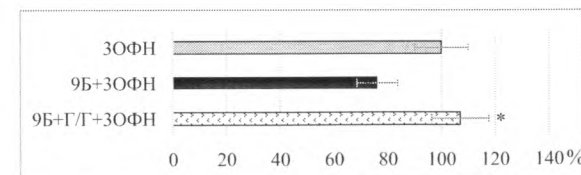


Рис. 11. Эффект адаптации к гипоксии-гипероксии на физическую выносливость в условиях применения токсикантов. Представлена медиана времени удержания животных на воде от 3ОФН, принятого за 100%. 3 ОФН - трехкратная ОФН; 9Б+3ОФН - токсиканты в течение 9 дней, с последующей 3 ОФН; 9Б+Г/Г+3ОФН - токсиканты в течение 9 дней на фоне адаптации к гипоксии-гипероксии, с последующей 3 ОФН. * - достоверность отличий ($p < 0,05$) от группы 9Б+3ОФН (Mann-Whitney U Test).

Оценка параметров поведения животных показала, что проведение адаптации к Г/Г на фоне введения токсикантов поддерживает двигательную-ориентировочную активность на уровне контроля (Рис.12) и предупреждает повышение компоненты тревожности поведения.

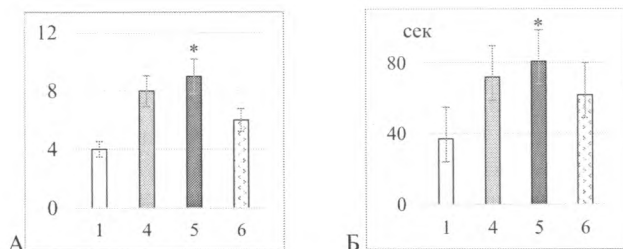


Рис.12 Двигательно-ориентировочная активность животных в тесте ПКЛ. А) Количество эпизодов движения в тесте по группам. **Б)** Общее время движения (сек). **Контроль (1); 3 ОФН (4)** - трехкратная ОФН в 3 последних дня эксперимента; **9Б+3ОФН (5)** - токсиканты в течение 9 дней, с последующей 3 ОФН; **9Б+Г/Г+3ОФН (6)** - токсиканты в течение 9 дней на фоне адаптации к Г/Г, с последующей 3 ОФН.

Так, в тесте ПКЛ в группе с адаптацией к гипоксии-гипероксии на фоне введения токсикантов (9Б+Г/Г+3ОФН) отмечены сохранение максимальной скорости движения животных на уровне контроля, в отличие от групп 9Б+3ОФН и 3ОФН, нормализация общего времени движения и количества эпизодов движения, в тесте «открытое поле» отмечена нормализация количества стоек и заглядываний в норки в группе 9Б+Г/Г+3ОФН, что в целом свидетельствует о поддержании уровня двигательной ориентировочной активности.

При оценке параметров тревожности оказалось, что адаптация к Г/Г обладает защитным эффектом, выражающимся в снижении стрессорной компоненты поведения. Так, отсутствие выраженных изменений количества эпизодов неподвижности в тесте ПКЛ в сочетании с уменьшением общего времени груминга и нормализации общего времени движения в результате проведения адаптации к Г/Г на фоне введения токсикантов указывает на уменьшение компоненты тревожности поведения животных в группе 9Б+Г/Г+3ОФН.

Таким образом, адаптация к Г/Г предупреждает стрессорную компоненту действия токсикантов: поддерживается контрольный уровень двигательной ориентировочной активности, свободнорадикального окисления, ферментов антиоксидантной защиты, снижена компонента тревожности поведения. Однако при кратковременной адаптации сохраняется необходимость поддержания высокого уровня синтеза защитных систем в печени.

Суммируя результаты работы в целом можно заключить, что: защитный эффект предварительной двухнедельной адаптации к гипоксии-гипероксии проявляется как при кратковременном, так и при длительном введении токсикантов, сопровождается поддержанием или увеличением физической выносливости, компенсацией свободнорадикальных процессов, активированных токсикантами, нормализацией баланса прооксидантов и антиоксидантов и уровня других компонентов внутриклеточной редокс-сигнализации - транскрипционного фактора HIF-1α и индуцируемых им белков. Показан защитный эффект

кратковременного курса адаптации к гипоксии-гипероксии, проведенного одновременно с введением малых доз токсикантов.

ВЫВОДЫ

1. Проведение многократных сеансов нормобарической непрерывной гипероксии приводит к индукции окислительного стресса - повышению интенсивности свободнорадикальных процессов, уровня белков семейства HSP - HOx-1 и HSP72, а также компоненты тревожности поведения. Добавление гипероксической компоненты в классическую адаптацию к гипоксии и проведение ее в интервальном режиме повышает двигательную ориентировочную активность, сохраняет физиологический баланс прооксидантов и антиоксидантов, приводя к росту резистентности мембранных структур.

2. Введение токсикантов в малых дозах приводит к снижению физической выносливости животных, задержке роста, увеличению интенсивности свободнорадикального окисления, активности ферментов антиоксидантной защиты, повышению уровня HIF-1α и белков семейства HSP. Увеличение длительности введения токсикантов повышает стрессорную компоненту воздействия.

3. Предварительная адаптация к гипоксии-нормоксии или гипоксии-гипероксии позволяет восстановить сниженную при действии токсикантов выносливость животных, предупреждает повышенный уровень HIF-1α и HOx-1. Предварительная адаптация к гипоксии-гипероксии обладает дополнительным защитным эффектом и позволяет достоверно повысить выносливость животных, нормализовать уровень свободнорадикального окисления.

4. При увеличении длительности введения токсикантов защитный эффект проявляет предварительная адаптация к гипоксии-гипероксии, но не к гипоксии-нормоксии, что выражается в повышении выносливости животных, снижении высокого уровня фактора HIF-1α, компенсаторном изменении увеличенного уровня защитных белков семейства HSP.

5. При проведении короткого курса адаптации к гипоксии-гипероксии на фоне введения токсикантов показан защитный эффект, который выражается в увеличении резистентности мембранных структур к свободнорадикальным процессам, нормализации уровня АФК-индуцибельных и конститутивных форм белков HSP, повышении физической выносливости организма.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Сазонтова Т.Г., Треглазов В.В., Болотова А.В., Полянская А.А., Бедарева И.В., **Костина Н.В.**, Архипенко Ю.В. Адаптация к гипоксии и гипероксии предупреждает активацию свободнорадикальных процессов в мозге крыс при физических нагрузках со стрессорной компонентой // Тезисы доклада конф. с межд. уч. «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологич. состояний мозга», Санкт-Петербург-Колтуши. – 2008. – С.116-117.
2. Sazontova T.G., Bolotova A.A., **Kostina N.V.**, Anchishkina N.A., Bedareva I.V., Yurasov A.R., Arkhipenko Yu.V. Transcription factors HIF-1 α , HSPs and antioxidant enzymes in endurance of exercise performance // Abstr. IX World Congress of the Intern. Society for Adaptive Medicine, Taipei, Taiwan. – 2009. – P.58.
3. Сазонтова Т.Г., Болотова А. В., **Костина Н.В.**, Хайруллина А.А., Архипенко Ю.В. Адаптация к гипоксии и гипероксии предупреждает развитие стрессорных состояний при действии малых доз токсикантов // Патогенез. – 2011. – №3. Материалы 6 Росс. конф. с межд. участием Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. – Изд. НИИОППФ Москва. – 2011. – С. 58.
4. Sazontova T.G., Bolotova A.V., Bedareva I.V., **Kostina N.V.**, Yurasov A. R., Arkhipenko Y.V. Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α), HSPs, antioxidant enzymes and membrane resistance to ROS in endurance exercise performance after adaptive hypoxic preconditioning // Adaptation biology and medicine. Narosa Publishing House, New Delhi. – 2011. – Vol. 6. – P. 161–179.
5. Сазонтова Т.Г., Глазачев О.С., Болотова А.В., Дудник Е.Н., **Стряпко Н.В.**, Бедарева И.В., Анчишкина Н.А., Архипенко Ю.В. Адаптация к гипоксии и гипероксии повышает физическую выносливость: роль активных форм кислорода и редокс сигнализации // **Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова.** – 2012. – Т.98. – N 6. – С. 793-807.
6. Sazontova T.G., Bolotova A.V., Bedareva I.V., **Kostina N.V.**, Arkhipenko Y.V. Adaptation to intermittent hypoxia/hyperoxia enhances efficiency of exercise training. // in: Intermittent hypoxia and human diseases. – Springer Dordrecht, Heidelberg, New York, London. – 2012. – P. 191-206.
7. Сазонтова Т.Г., **Стряпко Н.В.**, Костин А.И., Вдовина И.Б., Куликов А.Н., Архипенко Ю.В. Эффект кратковременной адаптации к гипоксии и гипероксии на редокс сигнализацию и физическую выносливость в условиях действия токсикантов в малых дозах // **Вестник Санкт-Петербургского университета.** Серия 11. Медицина. – 2013. – N 2. – С. 195-200.
8. Жукова А.Г., Алёхина Д.А., Сазонтова Т.Г., Прокопьев Ю.А., Горохова Л.Г., **Стряпко Н.В.**, Михайлова Н.Н. Механизмы внутриклеточной защиты и активность свободнорадикального окисления в миокарде крыс в динамике хронической фтористой интоксикации // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2013. – Т.156. – N 8. – С.190-194.
9. **Стряпко Н.В.**, Сазонтова Т.Г., Костин А.И., Вдовина И.Б., Архипенко Ю.В. Сравнение эффекта адаптации к гипоксии и гипероксии при действии токсикантов в малых дозах // Вестник САФУ, сер. Медико-биол. науки. – 2013. – N 4. – С.61-69.
10. **Stryapko N.V.**, Sazontova T.G., Hajrullina A.A., Vdovina I.B., Kulikov A.N., Arkhipenko Yu.V. Antitoxic effect of adaptation to hypoxia and hyperoxia:redox signaling and physical endurance in the model of low dose intoxication by chromium and benzene // X Anniversary Ukrainian - Polish - Belorussian Conference "Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications" Kiev, 10-13 October, 2013 - Фізіол. журн. – 2013. – Т. 59. – N 4 – С.45.
11. **Стряпко Н.В.**, Хайруллина А.А., Куликов А.Н. Эффект адаптации к изменению

уровня кислорода – гипоксии и гипероксии - на физическую выносливость и редокс сигнализацию в условиях интоксикации. // XVI Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием) - Фундаментальная наука и клиническая медицина - Человек и его здоровье. - СПб.: Изд-во СПбГУ. - 2013. – Т. XVI - С.391.

12. **Стряпко Н. В.** «Антитоксический эффект предварительной адаптации к гипоксии и гипероксии – роль редокс сигнализации». // Материалы Научно-практической конференции с международным участием «Реабилитация и профилактика – 2013», Москва 26-27 сентября. – 2013. – С.52.

13. Сазонтова Т.Г., **Стряпко Н.В.**, Сорокина А.Г., Бедарева И.В., Архипенко Ю.В. Эффект адаптации к изменению уровня кислорода, проводимой предварительно или одновременно с введением токсикантов // **Технологии живых систем.** – 2014. – N 2. – С.54.

14. **Стряпко Н.В.**, Сазонтова Т. Г., Потиевская В. И., Хайруллина А. А., Вдовина И. Б., Куликов А. Н., Архипенко Ю. В., Молчанов И.В. Адаптационный эффект многократного применения ксенона // **Общая реаниматология.** – 2014 - Т.10. – N 1. – С.43-50.

15. Arkhipenko Y., Vdovina I., **Kostina N.**, Sazontova T., Glazachev O. Adaptation to interval hypoxia-hyperoxia improves exercise tolerance in professional athletes: experimental substantiation and applied approbation // European Scientific Journal. – 2014. – Vol.10 – N.18. – P.135-154.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A₅₃₂– оптическая плотность при 532 нм
Cat – каталаза
GR–глутатионредуктаза
HIF-1 α – гипоксия индуцируемый фактор (hypoxia-induciblefactor-1)
HO α -1, (HSP32) - индуцибельная форма гем-оксигеназы
HSP72 – индуцибельная изоформа белка HSP70
HSC73 – конститутивная изоформа белка HSP70

SOD – супероксиддисмутаза
АФК – активные формы кислорода
Г/Г – адаптация к гипоксия-гипероксии
Г/Н – адаптация к гипоксия-нормоксии
ОДЕ – относительные денситометрические единицы
ОФН – острая физическая нагрузка
ОП – поведенческий тест «открытое поле»
ПКЛ – поведенческий тест «приподнятый крестообразный лабиринт»
ТБК – тиобарбитуровая кислота