

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

Болгова Тетяна Вікторівна

УДК 612.233+612.176:577.151.6

**СТРУКТУРНО-ДИНАМІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ
ОСОБЛИВОСТІ МІТОХОНДРІЙ ЛЕГЕНЬ І СЕРЦЯ ПРИ РІЗНИХ РЕЖИМАХ
ІНТЕРВАЛЬНИХ ГІПОКСИЧНИХ ТРЕНУВАНЬ**

03.00.13-фізіологія людини і тварин

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі по вивченню гіпоксичних станів в Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця Національної Академії Наук України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Маньковська Ірина Микитівна,
завідувач відділу по вивченню гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Янчук Петро Іванович
професор кафедри фізіології людини та тварин
ННЦ „Інститут біології” Київського Національного
Університету ім. Тараса Шевченка

доктор медичних наук, професор
Абрамов Андрій Володимирович
професор кафедри патофізіології
Запорізького Державного Медичного Університету

Захист дисертації відбудеться «15» листопада 2016 року о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті інституту www.biph.kiev.ua

Автореферат розісланий «13» жовтня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



О.П.Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним із механізмів взаємозв'язку організму з оточуючим середовищем є реакція на зміни концентрації кисню, що супроводжує як фізіологічні, так і патологічні процеси (Лир 1947). Розвиток гіпоксичного стану характеризується каскадом адаптивних (чи дезадаптивних) змін, котрі розвиваються як на органному, так і на молекулярному рівнях організації живої матерії (Меерсон 1989). Ці зміни відображаються на функціонуванні систем постачання кисню (в тому числі, й основних органів, що відповідають за киснезабезпечення організму - серці та легенях), ефективності його споживання та утилізації в клітинних реакціях та, як наслідок, можуть сприяти підвищенню резистентності як до самої гіпоксії (Г), так і до інших ендо- та екзогенних впливів (Малкин та ін. 1997; Агаджанян та ін. 2003, Шевченко 2000; Giassia at al. 2016). Отриманий «адаптивний резерв», в подальшому, можна використовувати для попередження та корекції гіпоксичних станів різного генезу (Агаджанян 2003). Прикладом такого використання саногенного ефекту гіпоксії (Березовський 2004) є інтервальні гіпоксичні тренування (ІГТ). ІГТ широко застосовують у якості нефармакологічного засобу як для профілактики і корекції гіпоксичних станів так і для підвищення загальної резистентності організму (Караш 1998; Колчинская 2003; Стрелков 2001; Шатило 2005; Faiss at al. 2013).

Технологія методу ІГТ була розроблена ще у кінці 70-років ХХ століття Р.Б.Стрелковим і А.Я.Чижовим (Караш 1998, Чижов 2008). На сьогодні, доведена можливість підвищення фізичної, інтелектуальної, емоційної витривалості та накопичений значний досвід профілактики і лікування низки захворювань і патологічних станів за допомогою ІГТ (Жулинський 1998, Gonzales-Rothi 2015, Serebrovskaya 2012, Маньковська 2016). Однак, не дивлячись на достатньо широке застосування ІГТ, механізми, які формують адаптивну відповідь на тканинному, клітинному та молекулярно-генетичному рівнях є досі предметом наукових досліджень. Встановлено, що будь-який з режимів ІГТ, поряд із корегуючою дією, має й деструктивну компоненту (Neubauer 2001), ступінь якої прямо залежить від вмісту кисню у гіпоксичній суміші газів, тривалості епізодів гіпоксія/нормоксія (Маньковська 2014). Саме тому, вивчення патогенетичних шляхів розвитку деструктивних змін при гіпоксичних тренуваннях дасть змогу в майбутньому оптимізувати конструктивний ефект гіпоксичних тренувань. Предметом наукових досліджень залишається межа між конструктивною та деструктивною відповіддю на ІГТ та можливі маркери переходу до дезадаптивних змін (Serebrovskaya 2015). Відповідь на гіпоксичний стимул носить виражений органоспецифічний характер (Розова 2009), однак питання органоспецифічності впливу ІГТ залишається не розкритим.

Загальновідомо, що мітохондрії (Мх) посідають важливу роль у складній архітектурі адаптації до Г - найбільш чутливих до неї органел (Semenza 2007), завдяки унікальній будові їх мембран, наявності власного геному, здатності до руху (процеси злиття-роз'єднання) та домінуючій ролі у клітинному метаболізмі (Scarpulla 2012, Valero 2014). Гіпоксичний стимул ініціює каскад структурно- динамічних (Rozova 2015) та функціональних (Lukyanova 2013) змін Мх, призводить до модуляції

інтенсивності їх біогенезу (Маньковська 2014). Проблема «Мх і гіпоксія» була і залишається центральною в дослідженнях розвитку гіпоксичних станів різного генезу (Пауков 1991; Сапрунова та ін. 2003; Giassia 2004 at al.; Розова та ін. 2005; Semenza 2007; Рямова 2008; Стешенко та ін. 2010), їх профілактики і корекції (Portnichenko at al., 2010; Faiss at al., 2013; Gonzales-Rothi at al., 2015; Serebrovskaya 2015). Проте робіт, які описують структурно-динамічні та функціональні зміни Мх, під час застосування ІГТ вкрай мало для чіткого розуміння шляхів формування адаптивної відповіді у Мх, особливо на різні режими ІГТ (із гіпоксичною компонентою різного ступеня жорсткості, тривалості періодів гіпоксії/нормоксії, періодичності та тривалості тренування).

Якщо роль Мх в розвитку гіпоксії вивчена більш-менш достатньо (Sazontova 2008; Semenza. 2009; Lukyanova 2015), то даних, які описують морфологічні та функціональні зміни, що відбуваються у Мх навіть під час застосування найбільш поширених режимів ІГТ (із гіпоксичною компонентою різного ступеня жорсткості, тривалості періодів гіпоксії/нормоксії, періодичності та тривалості тренування) описані вкрай мало для розуміння механізмів, що лежать в основі формування виражених конструктивних змін (та переваги їх над деструктивними) і зумовлюють адаптивний вплив ІГТ.

Вибір газової суміші саме такого складу був зумовлений тим, що зниження концентрації кисню до 12% здатне виявити початок формування адаптивних реакцій до гіпоксичного впливу, тоді як застосування газової суміші з 7% O_2 дає можливість окреслити межі адаптивних можливостей організму як на системному, так і на тканинному рівні (Малкин 1977; Маньковська 2014). Для того, щоб виявити «якість» адаптивних змін мітохондріального апарату, котрі розвивалися на тлі досліджуваних ІГТ, було застосовано гостре гіпоксичне навантаження (ІГТ 7% O_2 в N_2 протягом 30 хв).

Враховуючи вищезазначене, слід підкреслити, що у формуванні адаптивних змін при гіпоксичному тренуванні важлива роль може належати Мх, і, ймовірно, саме вони є тією ключовою ланкою, яка визначає адаптивну чи дезадаптивну дію інтервальної гіпоксії. Тому розкриття та уточнення механізмів адаптації до періодичної гіпоксії може сприяти потенційно новому підходу до застосування ІГТ для підвищення резистентності організму.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу по вивченню гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України «Дослідження механізмів адаптації організму людини і тварин до різних режимів інтервальної гіпоксичної гіпоксії» (№ держреєстрації 0105U003238).

Мета роботи. Метою даної роботи було дослідження морфо-функціональних змін мітохондріального апарату легень і серця щурів, що розвивалися на тлі застосування двох режимів ІГТ: із помірною гіпоксичною складовою - 12% O_2 в N_2 - та більш жорсткого режиму ІГТ - із 7% O_2 в N_2 .

Завдання дослідження. Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Встановити особливості ультраструктури мітохондріального апарату легень і серця на тлі застосування ІГТ із 12% O₂ в N₂, та 7% O₂ в N₂ в газовій суміші.

2. Провести морфо- та стереометричний аналіз мітохондріального апарату легень і серця при застосуванні обраних режимів ІГТ.

3. Визначити зміни мітохондріальної динаміки у легенях і серці при дії ІГТ із 12% O₂ в N₂ та 7% O₂ в N₂ у вдихуваній суміші газів.

4. Оцінити функціональний стан Мх (дихання та окисне фосфорилування) легень та серця при застосуванні двох обраних режимів ІГТ.

5. З'ясувати інтенсивність біогенезу Мх в легенях і серця за рівнем експресії мРНК NRF-1 за вище зазначених умов.

6. Встановити органоспецифічність впливу ІГТ на структуру, динаміку, біогенез та дихальну функцію Мх легень і серця.

7. Оцінити ефективність впливу ІГТ на структуру, динаміку, біогенез та дихальну функцію Мх легень і серця, порівнюючи наслідки дії гострої гіпоксичної гіпоксії (ГГ) у нетренованих та тренуваних тварин.

Об'єкт дослідження: мітохондріальний апарат легень (респіраторний відділ) і серця (міокард) щурів.

Предмет дослідження: структурно-динамічні та функціональні особливості мітохондрій легень і серця при двох режимах інтервальних гіпоксичних тренувань та після тестуючої дії ГГ.

Методи дослідження: фізіологічні, електронно-мікроскопічні, морфо- та стереометричні, генетичні, статистичні.

Наукова новизна роботи. В роботі досліджено вплив двох режимів ІГТ на ультраструктуру, динаміку, біогенез, дихання та окисне фосфорилування Мх легень і серця, а також на рівні експресії мРНК NRF -1.

Вперше зафіксовано, що формування адаптивної відповіді при ІГТ із помірною гіпоксичною складовою у легенях і міокарді відбувається за рахунок активізації біогенезу Мх, їх динаміки, зміни форми крист на більш енергоємну та на функціональному рівні супроводжується зростанням ефективності фосфорилування та величини дихального контролю при окисненні НАД-залежних субстратів, що вказує на підвищення енергетичного стану клітини.

Вперше показано, що адаптивний вплив ІГТ із 7% O₂ в N₂ також проявлявся в активізації біогенезу Мх, однак, на фоні виражених деструктивних змін у Мх (зростання вакуолізованих органел, пошкодження мембран Мх, розрідження крист, просвітлення матриксу, поява мієлінізованих органел у міокарді), цей режим ІГТ не призводив до підвищення функціональної потужності Мх, хоча дозволяв підтримувати її на рівні контрольних показників.

Вперше показано, що важливу роль у формуванні адаптивних змін під час ІГТ грають динамічні властивості мітохондріального апарату легень і серця.

Вперше проведено дослідження рівнів експресії одного із факторів біогенезу Мх легень і серця - гену NRF-1. Було показано, що високі рівні експресії мРНК NRF -1 ініціюються застосуванням більш жорстких гіпоксичних впливів, тоді як при ІГТ із помірною гіпоксичною складовою реєстрували помірне зростання рівнів експресії мРНК NRF 1 в обох досліджуваних органах. Такі дані дозволяють розглядати рівні

експресії цього фактору як можливу межу адаптивних та дезадаптивних змін, що формуються під час різних режимів ІГТ.

Вперше з'ясовано, що ефективність адаптивних перебудов (що виявляються на фоні тестуючої дії гострого гіпоксичного навантаження) під час проведення ІГТ із 12% O₂ в N₂ пов'язана з підвищенням інтенсивності роботи дихального ланцюга Мх за умов окиснення як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів. Ці зміни пов'язані із підвищенням споживання кисню (фосфорилуючого та контрольованого дихання), ефективності використання кисню для синтезу макроергів та спряження дихання із фосфорилуванням. На рівні органел такі адаптивні зміни супроводжувалися активізацією біогенезу Мх, зсувом динамічної рівноваги у бік злиття, зменшенням кількості структурно-змінених органел.

Вперше зафіксована відсутність виражених адаптивних перебудов енергетичної функції Мх легень і серця, що виявлялася після тестуючого гіпоксичного навантаження, застосованого на фоні ІГТ з 7% O₂ в N₂. Зниження функціональної потужності Мх у легенях і серці супроводжувалося зростанням серед мітохондріальної популяції органел із деструктивними змінами, деякі з яких свідчили про повну втрату їх функціональних можливостей.

Проведене порівняння органоспецифічних особливостей Мх легень і серця, що розвивалися на тлі застосування гіпоксичних тренувань, вказує на те, що у серці адаптивний потенціал та конструктивні перебудови мітохондріального апарату після застосування обох досліджуваних режимів ІГТ мали більш виражений характер.

Практичне значення отриманих результатів. Результати проведених досліджень дозволили встановити структурно-динамічні та функціональні особливості мітохондріального апарату легень і серця (що формуються на тлі застосування двох режимів ІГТ - із помірною та більш жорсткою гіпоксичною складовою) та оцінити ефективність адаптивних перебудов, які мають місце при застосуванні обраних режимів ІГТ. Інтерпретація отриманих даних дозволяє ширше поглянути на механізми адаптації до різних режимів ІГТ та поглиблює вже існуючі знання про формування адаптивної відповіді на гіпоксичні стимули різного типу.

Застосування режиму ІГТ із помірною гіпоксичною складовою впродовж трьох тижнів дозволило сформувати структурно-динамічні та функціональні адаптивні перебудови в обох досліджуваних тканинах та не призводило до суттєвих деструктивних змін. Застосування ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою також супроводжувалося деякими адаптивними змінами Мх, хоча їх вираженість була значно меншою.

Отримані експериментальні дані дозволяють припустити, що ІГТ із помірною гіпоксичною складовою у клінічній і спортивній практиці може виступати як ефективний нефармакологічний метод підвищення адаптивних резервів легень і серця, однак, враховуючи певні деструктивні зміни Мх, бажано застосовувати цей метод у комплексі із іншими антигіпоксичними засобами.

Ймовірність підвищення адаптивного резерву у легенях і серці за допомогою ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною компонентою також можлива, однак, виходячи із наших даних, лише для організму, який має високу стійкість до гіпоксичних стимулів.

Результати проведених досліджень можуть знайти використання у клінічній та спортивній практиці з метою попередження розвитку гіпоксичних пошкоджень Мх легень і серця та підвищення функціональної потужності цих тканин. Отримані результати можуть бути впроваджені в навчальному процесі при викладанні курсів фізіології людини і тварин, нормальної і патологічної фізіології для студентів біологічних і медичних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача полягав в: обґрунтуванні обраного напрямку досліджень, формулюванні (під керівництвом наукового керівника) мети та основних завдань роботи, самостійному аналізі робіт вітчизняних і зарубіжних науковців за тотожною тематикою, підборі необхідних методів досліджень та оволодіння ними, виконанні експериментальної частини дисертаційної роботи, опрацюванні отриманих результатів та статистичній обробці, інтерпретації отриманих даних, їх узагальненні та презентації у наукових публікаціях та доповідях. Частина досліджень виконувалася зі співавторами публікацій (К.В.Розова; І.М.Маньковська; В.І.Носар; Т.І.Древицька та ін.).

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації обговорювалися та доповідалися на: конференції «Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения» (Сімферополь, 2006); XVII з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 125-річчю від народження академіка О.О.Богомольця (Чернівці, 2006); науковій конференції з міжнародною участю «Высокогорная гипоксия и геном» (Терскол, Кабардино-Балкария, Россия, 2008); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Реабилитация и профилактика» (Москва, Россия, 2013 та 2014); XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 90-ти річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка (Львів, 2014); VI Пленумі наукового товариства патофізіологів України та науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної патофізіології» (Вінниця, 2014)/Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації» (Запоріжжя, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у фахових наукових журналах та 6 тез доповідей на наукових конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Робота викладена на 140 сторінках друкованого тексту і включає: вступ, огляд літератури, розділ «Об'єкт та методи досліджень», 2 розділи власних досліджень, аналіз і узагальнення отриманих результатів, висновки і список використаних джерел, який включає 184 джерела. Дисертація ілюстрована 24 рисунками та 12 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. Для вирішення поставлених задач дослідження проведені на 65 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-200г. Всі маніпуляції з тваринами проведено відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших

цілей (Страсбург, 1986), принципами Гельсінської Декларації (2000), а також згідно положенням Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ.

Тварини були поділені на шість груп: перша група (n=12) - контрольні інтактні тварини; тварини другої групи (n=11) дихали гіпоксичною газовою сумішшю з 7% O₂ в N₂ протягом 30 хв. Саме такий вміст O₂ у вдихуваній суміші газів дає можливість визначити межі адаптивних можливостей організму як на системному, так і на клітинному рівнях (Малкин 1977). Тварини третьої (n=10) і четвертої (n=11) груп дихали газовою сумішшю з 12% O₂ в N₂ протягом 5 хв з чергуванням з 15-ти хвилинним диханням повітрям. Цей цикл повторювали 4 рази на день протягом трьох тижнів, після чого тварини четвертої групи додатково проходили тестування: дихали сумішшю з 7% O₂ в N₂ протягом 30 хв. Тварини п'ятої (n=10) і шостої (n=11) груп дихали гіпоксичною сумішшю з 7% O₂ в N₂ протягом трьох тижнів за такою ж схемою, як і тварини третьої і четвертої груп. Після проведення експерименту тварин декапітували під слабким ефірним наркозом і брали зразки легень і серця для подальших досліджень: електронномікроскопічного, полярографічного та молекулярно-генетичного.

Ультраструктуру Мх у тканинах легень та в міокарді досліджували електронномікроскопічним методом. Препарати для мікроскопії готували за загальноприйнятою методикою (Карупу, 1984). Зразки легень (з нижніх часток) та серця (апикальна частина) піддавали подвійній фіксації глутаральдегідом та оксидом осмію, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та заливали у суміш епоксидних смол (епон-аралдит). В дослідженнях використовували реактиви фірм Fluka (Швейцарія) та Sigma (США). Препарати досліджували за допомогою електронного мікроскопу ПЕМ-125 (Україна).

Стан мітохондріального апарату аналізували морфо- та стереометрично, оцінюючи загальну кількість Мх (N_i), кількість структурно-змінених Мх, середній діаметр Мх (D_i) та суму поверхонь Мх в одиниці об'єму (S_{itot}) (Вейбель, 1970; Ташке 1980). Загальну кількість мітохондрій N_i та кількість структурно-змінених Мх визначали простим підрахунком перетинів контурів поверхонь мітохондрій із тест-лінією. Діаметр мітохондрій D_i (середній тангенс-діаметр) визначали через прямопропорційне співвідношення числа перетинів на одиниці площі (N_{AI}) до кількості мітохондрій в одиниці об'єму (N_{VI}): $D_i = N_{AI} / N_{VI}$. Сумарну поверхню мітохондрій S_{itot} в даному об'ємі V знаходили за формулою: $S_{itot} = S_{vi} V$, де S_{vi} - щільність мітохондрій, яка прямопропорційна числу перетинів тест-ліній із контурами поверхні мітохондрій N_{li}: $S_{vi} = 2 N_{li}$. Об'єм V мітохондрій визначали шляхом накладання шаблону на вимірювану структуру, при цьому, доля точок, які попадали на перетини мітохондрій, рівнозначна їх об'єму (Ташке 1980).

Для дослідження рівнів експресії мРНК NRF-1 (одного із маркерів біогенезу Мх) спочатку виділяли із легень і серця тотальну РНК (Christophe 2006), а далі, за допомогою методу зворотної транскрипції синтезували ДНК та методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) багаторазово збільшували кількість фрагменту необхідного гену. Ампліфікати візуалізували шляхом горизонтального електрофорезу. Результати отримували шляхом аналізу електрофоретичних пластинок у програмі VitRan.

Дихання та окисне фосфорилування Мх вивчали полярографічним методом (Chance 1956) з використанням закритого електрода Кларка (Hansatech, Англія), зануреного в гомогенат, в комірці об'ємом 1 мл з постійним перемішуванням магнітною мішалкою при 26°C та приладу Оксиграф (Hansatech, Англія). Для полярографічного дослідження відразу після декапітації у тварин швидко вилучали тканини легень і серця, промивали охолодженим 0,9% розчином КСl (4°C). Потім тканини подрібнювали та гомогенізували у п'ятикратному об'ємі середовища гомогенізації. Середовище гомогенізації для легень містило (в ммоль/л): маннітолу - 225, сахарози - 75, EDTA - 2, MOPS - 5, BSA - 0.5%, рН - 7,2. Середовище для інкубації легень містило в ммоль/л: КСl - 145, КН₂РО₄ - 5, Tris НСl - 20, рН - 7,2 (А.В. Fisher 1973). Середовище гомогенізації для серця містило (в ммоль/л): КСl - 180, HEPES - 10, EDTA - 10, BSA - 0.5%, рН - 7,2 (А. Lass 1997). Середовище інкубації для серця містило (в ммоль/л): КСl - 125, NaCl - 10, КН₂РО₄ - 5, MgCl₂ - 1,5, EDTA - 3, Tris НСl - 30, рН - 7,2 (Vorutaite 1996). Субстратами окислення були: 5 мМ сукцинату натрію та 5 мМ глутамату натрію, 2,5 мМ малату натрію. Дихання Мх стимулювали додаванням 200 мкМ АДФ у полярографічну комірку. За отриманими хроно-амперометричними кривими розраховували такі показники: швидкість фосфорилуючого (в метаболічному стані 3 за Чансом, V₃) та контрольованого (в метаболічному стані 4 за Чансом, V₄) дихання Мх, дихальний контроль за Чансом (V₃/ V₄), коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О. Концентрацію білка вимірювали за методом Лоурі (Lowry, 1951).

Кількісні результати представлені як середні ± стандартна похибка середнього. Для визначення статистичної достовірності різниць міжгрупових середніх значень використовували t - тест Ст'юдента. Результати представляли у вигляді M ± m, що є коректним, оскільки отримані результати (у зв'язку зі значними масивами цифрових даних) вкладалися у розподіл Максвела. Визначали середнє арифметичне (M), стандартну похибку (m) та t коефіцієнт достовірності змін за Ст'юдентом, відмінності вважали достовірними при p<0,05.

Результати досліджень і їх обговорення

1. Дослідження структурно-динамічних змін Мх легень і серця після ІГТ.

Застосування ІГТ із 12% О₂ в N₂ призвело до зростання загальної кількості Мх легень в 2, 5 рази (Табл. 1), а в міокарді - в 2 рази в обох субпопуляціях Мх: субсарколемальній (СС Мх) та інтраміофібрилярній (ІМФ Мх) (Табл. 2), порівняно із контрольними показниками.

В обох тканинах зростав відсоток Мх невеликого розміру із несформованими кристами (юних Мх), що вказує на ініціацію процесів їх біогенезу. Однакове за ступенем зростання кількості Мх обох субпопуляцій у міокарді є одним із адаптивних механізмів такого режиму і вказує на зростання енергетичного потенціалу цих тканин. На це вказує і поява Мх із різними типами крист — пластинчастими, дугоподібними та кільцевими, (Rampelt 2016), що носить адаптивний характер.

На тлі застосування ІГТ із 12% О₂ в N₂ в обох досліджуваних тканинах зростав відсоток структурно-змінених органел (див. табл. 1, 2). Так, у легенях він збільшився у 3,3 рази, у міокарді - в 5,2 рази (СС Мх - 4,7 рази; ІМФ Мх - 5,6 рази).

Таблиця 1

Стереометричні характеристики мітохондрій легень після застосування ІГТ з 12% O₂ в N₂ та тестуючої дії ГГ (M±m, a=150)

Умови експерименту	Загальна кількість Mx, од./мкм ²	Кількість структурно змінених Mx, %	Середній діаметр Mx, мкм	Сума поверхонь Mx в одиниці об'єму тканини Si _{tot} , мкм ²
1. Контроль	9,6±0,2	4,6±0,5	0,39±0,01	5,7±0,5
2. ГГ (7%O ₂ 30хв)	15,1±0,6*	18,7±0,7*	0,51±0,02*	8,0±0,2*
3. ІГТ 12% O ₂ в N ₂	23,6±1,1*	15,0±0,9*	0,44±0,02*	8,2±0,4*
4. ІГТ 12% O ₂ в N ₂ + ГГ	21,0±0,8*#	16,3±0,6*#	0,43±0,02*#	7,8±0,5*

Примітки: * - відмінності достовірні відносно контролю (p<0,05); # - відмінності достовірні відносно ГГ (p<0,05); a – кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

Таблиця 2

Стереометричні характеристики мітохондрій міокарду після застосування ІГТ з 12% O₂ в N₂ та тестуючої дії ГГ (M±m, a=150)

Умови експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од./мкм ²		Кількість структурно змінених мітохондрій, %		Середній діаметр мітохондрій, мкм		Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини, мкм ²	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
1.Контроль	12,5 ±1,6	8,4 ±1,1	4,1 ±0,6	2,7 ±0,4	0,50 ±0,04	0,76 ±0,07	8,3 ±0,8	6,8 ±0,9
2.ГГ (7%O ₂ 30 хв)	33,7 ±3,4*	16,0 ±2,3*	26,8 ±4,7*	21,2 ±3,3*	0,74 ±0,09*	1,35 ±0,12*	14,9 ±1,6*	8,9 ±0,7*
3.ІГТ 12% O ₂	24,8 ±2,2*	15,6 ±1,7*	19,3 ±2,6*	15,1 ±1,7*	1,14 ±0,05*	1,24 ±0,08*	18,1 ±1,9*	13,4 ±1,1*
4.ІГТ 12% O ₂ + ГГ	28,2 ±1,7*	19,5 ±1,3* **	18,1 ±1,1* **	14,0 ±0,7* ***	0,98 ±0,06* #	1,04 ±0,10*	16,2 ±1,2* **	12,6 ±0,8*#* *

Примітки: * - відмінності достовірні відносно контролю (p<0,05); # - відмінності достовірні відносно ГГ (p<0,05) ** - відмінності достовірні відносно 3 до 4 (p<0,05); a – кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

Гетерогенність мітохондріальної популяції зросла як за рахунок конструктивних змін у морфології Mx (зміна форми крист, поява юних Mx, зростання кількості крист), так і за внаслідок деструктивних змін (просвітлення і розрідження матриксу, поява вакуолізованих органел, із різним ступенем лізису крист). ІГТ із 12%

O_2 в N_2 призвело до зростання величини середнього діаметру Мх легень (див. табл. 1) — у 1,2 рази і міокарду (див. табл. 2) - вдвічі у СС Мх та в 1,6 рази у ІМФ фракції Мх, порівняно із контролем. У легенях збільшення цього показника пов'язано з вакуолізацією Мх, тоді як у міокарді, переважно, зміною форми Мх із повздожньої (досить вираженої серед ІМФ фракції) на округлу.

Поява вакуолізованих органел вказує на зміну проникності мембран Мх, що зумовлена зростанням продукції АФК внаслідок розвитку гіпоксичного стану (Solaini 2010). У міокарді вакуолізовані Мх зустрічалися, як правило, в місцях з більшим міофібрилярним набряком і носили ознаки мітоптозу, що починається з внутрішньої мітохондріальної мембрани (Skulachev 1999; Kuznetsov 2009; Jaganmohan 2012). У легенях вакуолізовані Мх, як правило, зосереджувалися у місцях із спустошеними ламелярними тільцями та ендотеліальним набряком аеро-гематичного бар'єру. Сума поверхонь Мх в одиниці об'єму тканини (Si_{tot}) легень після ІГТ із 12% O_2 в N_2 достовірно зросла - в 1,4 рази (див. Табл. 1), а у міокарді — у СС Мх — у 2,2, а в ІМФ Мх — у 2 рази (див. табл. 2) по відношенню до контрольних величин. Більш виражене зростання цього показника в міокарді, порівняно з легенями, вказує на вищу енергетичну потужність Мх за рахунок збільшення довжини внутрішньої мембрани Мх — місця функціонування ферментів електрон-транспортного ланцюга.

Тестуюча дія ГГ у легенях тренуваних тварин (ІГТ 12% O_2 +ГГ) призвела до появи тенденції на зниження загальної кількості Мх (див.Табл.1), а у міокарді (див. Табл.2) - до достовірного зростання загальної кількості ІМФ Мх на 20%, по відношенню до ІГТ 12% O_2 . Кількість структурно-змінених органел у легенях по відношенню до ІГТ 12% O_2 достовірно не змінювалася, а у міокарді - дещо знижувалася (СС Мх - на 6,3%, ІМФ Мх - на 6,7%).

Величина середнього діаметру в обох досліджуваних тканинах не мала достовірних змін, порівняно із ІГТ 12% O_2 , хоча і мала тенденцію на зниження. Достовірно нижча величина середнього діаметру Мх легень (на 15,7%) та достовірно вища величина середнього діаметру СС Мх (24,5%) відносно ГГ вказує на органоспецифічний характер відповіді мітохондріального апарату легень та серця з одного боку, а з іншого - на більшу чутливість СС Мх до гіпоксії, порівняно з ІМФ Мх. Величина Si_{tot} у легенях після такого гіпоксичного впливу мала тенденцію на зниження, а у міокарді достовірно знижувалася (СС Мх - на 10,5%, ІМФ Мх - на 6%) порівняно з ІГТ 12% O_2 .

Така динаміка може вказувати на активацію роботи мітохондріального конвеєру (Palikaras, 2014): найбільш пошкоджені органели вчасно утилізуються і активують біогенез «повноцінних» органел, тим самим, підтримуючи мітохондріальний гомеостазис та збільшуючи знижену дією ГГ енергетичну потужність. У обох тканинах відбувався зсув динамічної рівноваги Мх з перевагою процесів злиття (Chen 2007; Zhou 2012), особливо у місцях пошкодження міофібрил (Рис. 1).

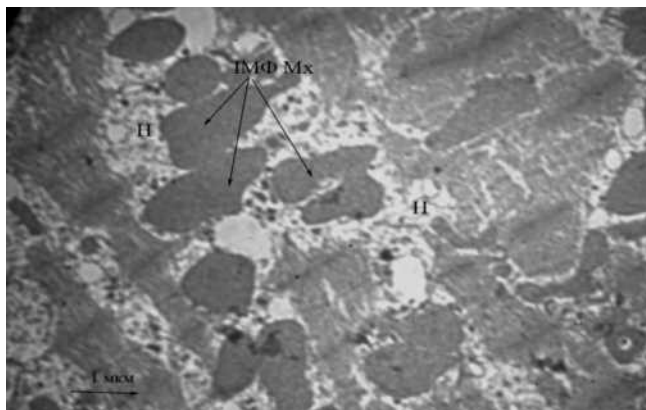


Рис. 1 - Ультраструктурні особливості Мх міокарду після ІГТ з 12% O₂ в N₂+ ІГТ.

Умовні позначення: Мх - мітохондрії, ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх, МФ - міофібрили, Н - набряк.

Зб. 9600

У легенях поряд з відносно неушкодженими органелами спостерігали Мх з різним ступенем вакуолізації. У міокарді, морфологічні ознаки такого комбінованого гіпоксичного впливу носили виражений мозаїчний характер і поряд із кардіоміоцитом із суттєвими деструктивними процесами (лізисом міофібрил, частковою чи повною втратою посмугованості, перикапілярним набряком) межував кардіоміоцит із практично відсутніми ознаками тканинної гіпоксії.

У таких кардіоміоцитах Мх, переважно дрібні і мали округлу форму із чітко окресленою зовнішньою мембраною, спостерігали насиченість рибосомами (що вказує на активні синтетичні процеси в клітині). Поодинокі зустрічалися Мх з вираженими ознаками мієлінізації (частіше ніж після ІГТ із 12% O₂ в N₂), які не здатні здійснювати свою енергетичну функцію (Гавриш 2013).

Морфо- та стереометричне дослідження впливу ІГТ із 7% O₂ в N₂ показало, що загальна кількість Мх у легенях і міокарді шурів зросла (Табл. 3, 4), порівняно із контрольними показниками (легені — 2 рази; міокард СС Мх — в 1,7 рази, ІМФ Мх — 1,4 рази) однак, дещо менше ніж під впливом ІГТ із 12% O₂ в N₂, що також вказує на меншу ініціюючу морфогенез Мх дію цього режиму ІГТ.

Відсоток структурно-змінених органел, по відношенню до контрольного показника, зріс в 6 разів (див. табл. 3), а у міокарді — в середньому 10,6 разів (СС Мх — в 10 разів ІМФ Мх — в 11,2 рази, (див. табл. 4). У легенях цієї групи тварин спостерігали появу більшої кількості Мх з частковою чи повною вакуолізацією, деструкцією внутрішньої і навіть зовнішньої мембрани, просвітленням матриксу. В Мх міокарду також спостерігали просвітлення матриксу та руйнування крист, однак поряд із такими деструктивними змінами в Мх, особливо серед ІМФ фракції, зустрічали функціонально активні Мх, із ущільненим матриксом та неушкодженими мембранами (що може свідчити про перевагу гліколітичного шляху утворення АТФ).

Таблиця 3

Стереометричні характеристики мітохондрій міокарду після застосування ІГТ з 12% O₂ в N₂ та тестуючої дії ГГ (M±m, a=150)

Умови експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од./мкм ²		Кількість структурно змінених мітохондрій, %		Середній діаметр мітохондрій, мкм		Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини, мкм ²	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
1.Контроль	12,5 ±1,6	8,4 ±1,1	4,1 ±0,6	2,7 ±0,4	0,50 ±0,04	0,76 ±0,07	8,3 ±0,8	6,8 ±0,9
2.ГГ (7%O ₂ 30 хв)	33,7 ±3,4*	16,0 ±2,3*	26,8 ±4,7*	21,2 ±3,3*	0,74 ±0,09*	1,35 ±0,12*	14,9 ±1,6*	8,9 ±0,7*
3.ІГТ 12% O ₂	24,8 ±2,2*	15,6 ±1,7*	19,3 ±2,6*	15,1 ±1,7*	1,14 ±0,05*	1,24 ±0,08*	18,1 ±1,9*	13,4 ±1,1*
4.ІГТ 12% O ₂ + ГГ	28,2 ±1,7*	19,5 ±1,3* **	18,1 ±1,1* **	14,0 ±0,7* ***	0,98 ±0,06*#	1,04 ±0,10*	16,2 ±1,2* **	12,6 ±0,8*#***

Примітки: * - відмінності достовірні відносно контролю (p<0,05);# - відмінності достовірні відносно ГГ (p<0,05) ** - відмінності достовірні відносно 3 до 4 (p<0,05); a - кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

Таблиця 4

Стереометричні характеристики мітохондрій міокарда після застосування ІГТ з 7% O₂ в N₂ та тестуючої дії ГГ (M± m, a=150)

Умови експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од./мкм ²		Кількість структурно змінених мітохондрій, %		Середній діаметр мітохондрій, мкм		Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини, мкм ²	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
1.Контроль	12,5 ±1,6	8,4 ±1,1	4,1 ±0,6	2,7 ±0,4	0,50 ±0,04	0,76 ±0,07	8,3 ±0,8	6,8 ±0,9
2.ГГ 7%O ₂ 30 хв	33,7 ±3,4*	16,0 ±2,3*	26,8 ±4,7*	21,2 ±3,3*	0,74 ±0,09*	1,35 ±0,12**	14,9 ±1,6*	8,9 ±0,7*
3.ІГТ 7%O ₂	21,1 ±2,3*	11,4 ±2,0	41,0 ±5,6*	30,4 ±4,4*	1,25 ±0,10*	1,43 ±0,09*	14,2 ±2,0*	10,1 ±1,0*
4.ІГТ 7%O ₂ +ГГ	19,3 ±2,2* #	10,0 ±1,6* #	45,2 ±6,0*#	38,7 ±3 1*#***	1,28 ±0,09*#***	1,46 ±0,11*	15,1 ±2,4*	11,5 ±1,6*#

Примітки: * - відмінності достовірні відносно контролю (p<0,05);# - відмінності достовірні відносно 4 до 2 (p<0,05) ** - відмінності достовірні відносно 3 до 4 (p<0,05); a - кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

Більш характерним для ІГТ із 7 % O_2 в N_2 було формування з боку сарколеми ворсинкоподібних утворень, що містили в собі СС Мх (Рис 2). Цей процес можна розглядати як адаптивний, що направлений на зменшення шляху дифузії кисню в кров капілярів. Такі «ворсинки сарколеми» в одних кардіоміоцитах були «розтягнені» набряком ендотеліоцитів гісто-гематичного бар'єру і містили СС Мх, що мали просвітлений матрикс і «розріджені» кристи, а в інших — такий набряк був відсутнім, СС Мх гуртувалися одна до одної і мали кулеподібну форму, трубчасті чи пластинчасті кристи. Така морфологічна гетерогенність Мх навіть однієї фракції вказує на різний енергетичний стан цих органел, а така мозаїчність є ще одним адаптивним механізмом пристосування до більш жорсткого режиму ІГТ. В кардіоміоцитах поодинокі зустрічалися мієлінізовані органели (що свідчить про розвиток дисфункції Мх), тоді як в легенях (як і при менш жорсткому гіпоксичному тренуванні) таких патологічних змін Мх не спостерігали.

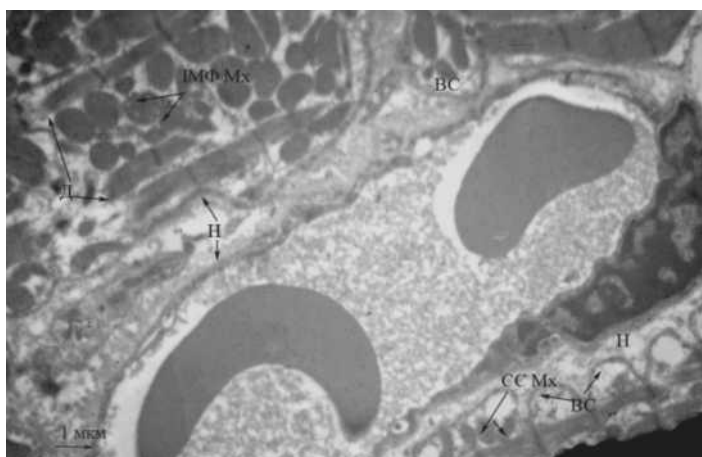


Рис. 2 - Ультраструктура тканини міокарду після ІГТ із 7 % O_2 в N_2 .

Умовні позначення: К - капіляр, ПКП - перикапілярний простір, СС Мх - субсарколемальні Мх, ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх, ВС - ворсинки сарколеми, Н - набряк, Д - деструкція.
Зб. 6900.

На тлі застосування ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою зросла і величина середнього діаметру Мх у легенях та серці (див. табл. 3, 4) (в легенях - в 1,8 рази; в міокарді: СС Мх — в 2,5 рази, в ІМФ Мх — в 1,8 рази) порівняно з контролем. Під час застосування ІГТ із 7% O_2 в N_2 , в обох досліджуваних органах показник Si_{tot} був вищим відносно контрольного (див. табл. 3, 4), що свідчить про виражений конструктивний ефект жорсткого режиму, обумовлений активацією їх морфогенезу застосуванням ІГТ: у легенях Si_{tot} зріс в 1,6 рази, а у міокарді — в 1,7 рази у СС Мх і в 1,5 рази у ІМФ Мх. Це може вказувати на зростання енергетичної потужності Мх за рахунок збільшення довжини внутрішньої мембрани та грати конструктивну роль на фоні описаних деструктивних змін у мітохондріальній популяції, тим самим, певною мірою, оптимізуючи енергетичний метаболізм клітини.

За допомогою ІГТ вдалося виявити, що режим ІГТ із 7% O_2 в N_2 сприяв зростанню мітохондріальної популяції у легенях тренуваних тварин, однак, поряд із цим підвищувалася гетерогенність Мх і відсоток пошкоджених органел. Пошкодження носили мозаїчний характер, і деякі Мх мали всі ознаки, що характерні для стадії незворотніх змін. (Рис.3).

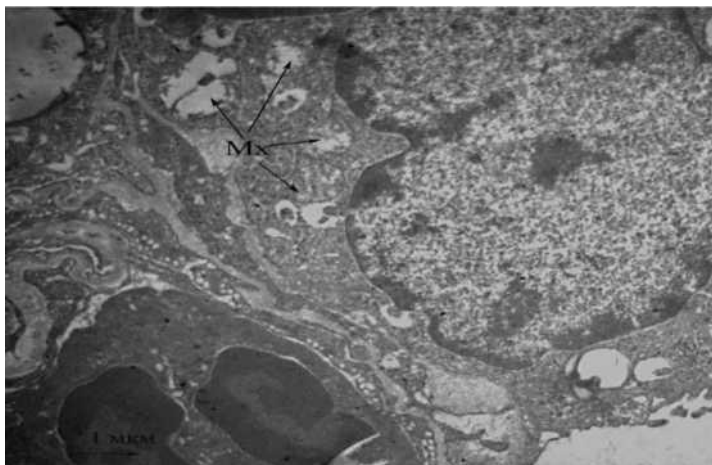


Рис. 3 - Особливості структурно-динамічних змін мітохондріального апарату легень після ІГТ із 7% O₂ в N₂ +ГГ.

Умовні позначення:

Mx - мітохондрії.

Зб. 6900

ГГ у легенях щурів, попередньо тренуваних ІГТ із 7% O₂ в N₂ викликало достовірне зростання загальної кількості Mx (на 15%), по відношенню до ГГ (див.табл.3). Кількість структурно змінених Mx була достовірно вищою (на 45%) по відношенню до ГГ та на 20% - по відношенню до ІГТ із 7% O₂ в N₂. Величина середнього діаметру Mx була достовірно вищою по відношенню до тварин, що піддавалися тільки ГГ (див. табл. 3). Тенденція до зменшення величини Si_{tot} (на 5,5% після дії ГГ на фоні проведеного ІГТ із 7% O₂, порівняно із Mx легень після ІГТ із 7% O₂) є, скоріш за все, наслідком пошкодження мембран Mx при такому додатковому гіпоксичному впливі та може вказувати на ймовірне зниження енергетичних процесів у Mx. Достовірно вища величина Si_{tot} (на 7 %) у легенях щурів після ІГТ із 7% O₂ +ГГ, по відношенню до групи щурів після 30-ти хвилинної „чистої” ГГ вказує на те, що у легенях збереження функціонування мітохондріальної популяції відбувалося в тому числі і за рахунок збільшення площі їх мембран.

Тестуюча дія ГГ, застосована на тлі ІГТ із 7% O₂ в N₂, призвела появи у міокарді щурів мієлінізованих, стрічкоподібних Mx та Mx «некласичної» форми. Динамічні зміни при цьому зсувалися у бік процесів злиття - особливо у місцях лізису міофібрил -що спричинило зростання розмірів. Вплив ГГ на Mx міокарда після курсу ІГТ із 7% O₂ в N₂ (див.табл.4.) характеризувався зниженням їх загальної кількості (на 8,5% у СС Mx та на 12,3% у ІМФ Mx), порівняно із ІГТ із 12% O₂. Спостерігали зростання кількості структурно-змінених органел (СС Mx на 41% та ІМФ Mx на 45,3%, порівняно з ГГ; ІМФ Mx - на 8,3% порівняно із ІГТ із 7% O₂ в N₂). Поряд із цим достовірно зростала (на 42,2%) величина середнього діаметру у СС Mx, та величина Si_{tot} у ІМФ Mx (на 22,6%) порівняно з ГГ. Отже, конструктивний вплив ІГТ ІГТ із 7% O₂ у міокарді може бути не тільки за рахунок зміни динамічних процесів Mx, а й за рахунок збільшення площі внутрішньої мембрани Mx - місця безпосереднього енергоутворення. Виражена перевага процесів злиття вказує на можливість міжмітохондріального обміну для оптимізації роботи пошкоджених гіпоксією Mx (Chan 2007; Li 2016), що є однією із ліній захисту мітохондріальної популяції (Langer 2008).

2. Дослідження експресії мРНК NRF-1 - одного із ключових маркерів біогенезу Мх - після ІГТ.

NRF-1 вперше був описаний як активатор гену цитохрому с (Evans, 1989). Сьогодні вже відомо (Chingman, 2016), що цей фактор транскрипції активує експресію кількох ключових генів, що регулюють ріст та розвиток клітини, ядерних генів, що регулюють процеси мітохондріального дихання, біосинтез гемму та транскрипцію і реплікацію мтДНК. Ми вперше досліджували рівні експресії мРНК цього важливого регулятора біогенезу Мх при ІГТ. Отримані дані вказують на те, що у міокарді в нормі рівні експресії мРНК NRF-1 є вищими в 4 рази від таких у легенях (Рис.4).

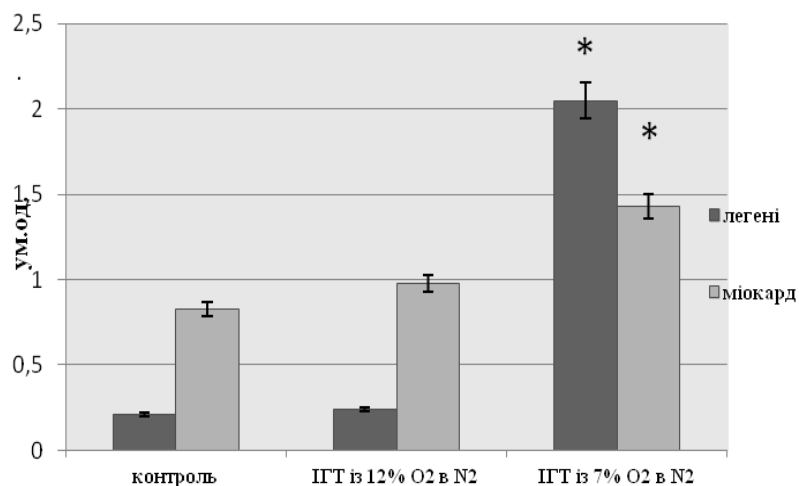


Рис. 4. - Експресія мРНК NRF-1 у легенях і серці після застосування двох режимів ІГТ. * - відмінності достовірні відносно контролю ($p < 0,05$).

Біогенез Мх активується різноманітними чинниками під час клітинного стресу чи сигналів від навколишнього середовища і є своєрідним протективним фактором. Ключовими регуляторами біогенезу Мх – маркерами біогенезу – прийнято вважати: PGC-1 α , NRF-1, NRF-2 та tfam. PGC-1 α є транскрипційним коактиватором, який активує NRF-2 та разом із ним NRF-1.

Застосування ІГТ із 12 % O₂ в N₂ викликало помірне зростання рівнів експресії мРНК NRF-1, яке не сягало 20 %, тоді як застосування ІГТ із 7 % O₂ в N₂ у легенях ініціювало десятикратне підвищення рівнів експресії мРНК NRF-1, а в міокарді - лише в 1,7 рази. Наприкінці 1990 р. було показано, що збільшення рівнів експресії мРНК мітохондріальних білків відбувається внаслідок оксидативного стресу (Suzuki, 1998). Результати сучасних досліджень вказують на наявність тісного взаємозв'язку між біогенезом Мх і рівнями АФК (Edgar, 2012), а наші дані також вказують на наявність взаємозв'язку між біогенезом Мх і ступенем пошкодження їх мембран.

Подібна динаміка спостерігалася і після впливу ГГ (Рис.5) - у легенях рівні експресії мРНК NRF-1 збільшилися у 8 разів, тоді як у міокарді - залишалися на рівні контрольних значень. Тестуюча дія ГГ, застосована на тлі ІГТ із 12 % O₂ в N₂, також викликала більш виражене зростання рівнів експресії мРНК NRF-1: у легенях - в 5,3 рази, а в міокарді - в 1,8 рази. ГГ, застосована на тлі проведеного ІГТ із 7 % O₂ в N₂, викликала зниження в 2 рази та підвищення на 30 % рівнів експресії досліджуваного гену.

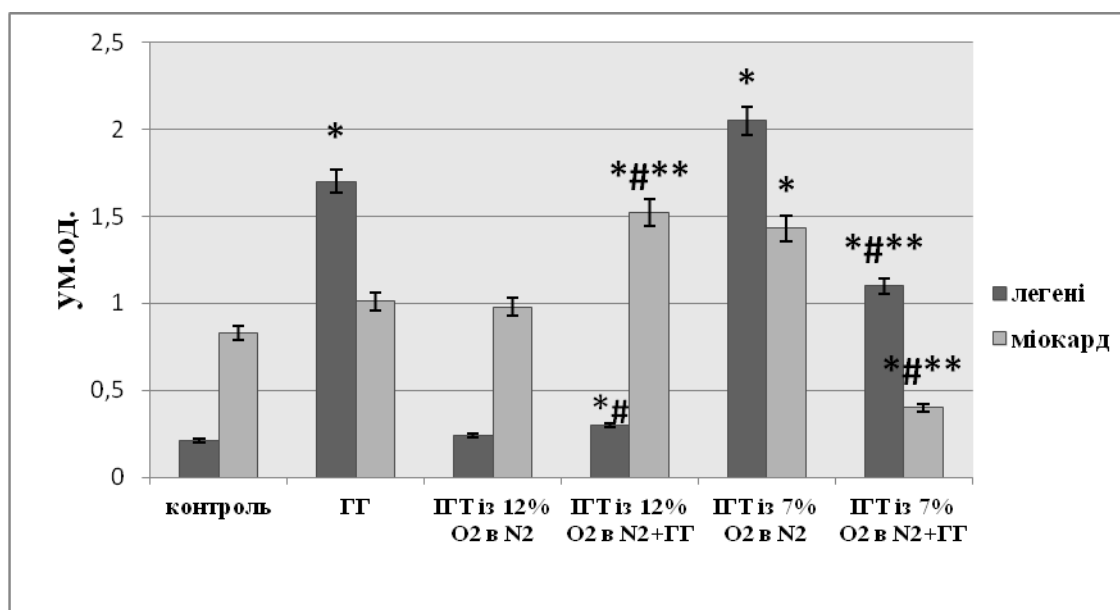


Рис.5. Експресія мРНК NRF-1 у легенях і міокарді після тестуючої дії ГГ, застосованої на тлі ІГТ із 12% та 7%O₂ в N₂ * - відмінності достовірні відносно контролю до ГГ (p<0,05); # - відмінності достовірні відносно ГГ до ІГТ 12% O₂+ ГГ (p<0,05);** - відмінності достовірні відносно ІГТ 12% O₂ до ІГТ 12% O₂+ ГГ (p<0,05).

Така динаміка змін може вказувати на те, що у легенях потреба у відбудові білків, синтез яких регулюється NRF-1, є вищою при гострому гіпоксичному впливі, порівняно із міокардом. Дані морфо- та стереометричного дослідження Мх легень і міокарду свідчать про більш виражене зростання гетерогенності мітохондріальної популяції міокарду, порівняно з легенями. У легенях гетерогенність Мх виражалася у появі Мх із різним ступенем вакуолізації. В таких Мх спостерігалось порушення регулярності крист і вакуолізація міжкристних проміжків. У міокарді гетерогенність Мх виражалася у появі Мх із різними типами крист (що розглядається як свідчення високої активності синтетичних процесів в органелі), появі мікроМх. Все це вказує на органоспецифічний характер формування адаптивної відповіді на ГГ у легенях і міокарді: у легенях адаптація супроводжується відновленням пошкоджених внутрішніх мембран Мх і активує підвищення рівня мРНК NRF-1, тоді як у міокарді для підтримання функціонального стану Мх «достатньо» перебудови крист у більш енергоємну форму та злагодженої роботи мітохондріального конвеєру.

3. Дослідження окисного фосфорилування в мітохондріях легень та серця при різних режимах ІГТ.

Нами було показано, що ІГТ із 12 % O₂ в N₂ викликає (Рис. 6 і 7 а, б) перебудову енергетичного обміну в тканинах шляхом посилення НАД-залежного окиснення, а це виступає одним із механізмів підвищення резистентності дихального ланцюга Мх до гіпоксії. При цьому відбуваються зміни кінетичних характеристик цитохром с оксидази, що запобігає інактивації ферментів дихального ланцюга при гіпоксії (Wheaton 2010). Так, у легенях це відбувається за рахунок підвищення швидкості фосфорилуючого дихання, спряження дихання із фосфорилуванням та ефективності фосфорилування.

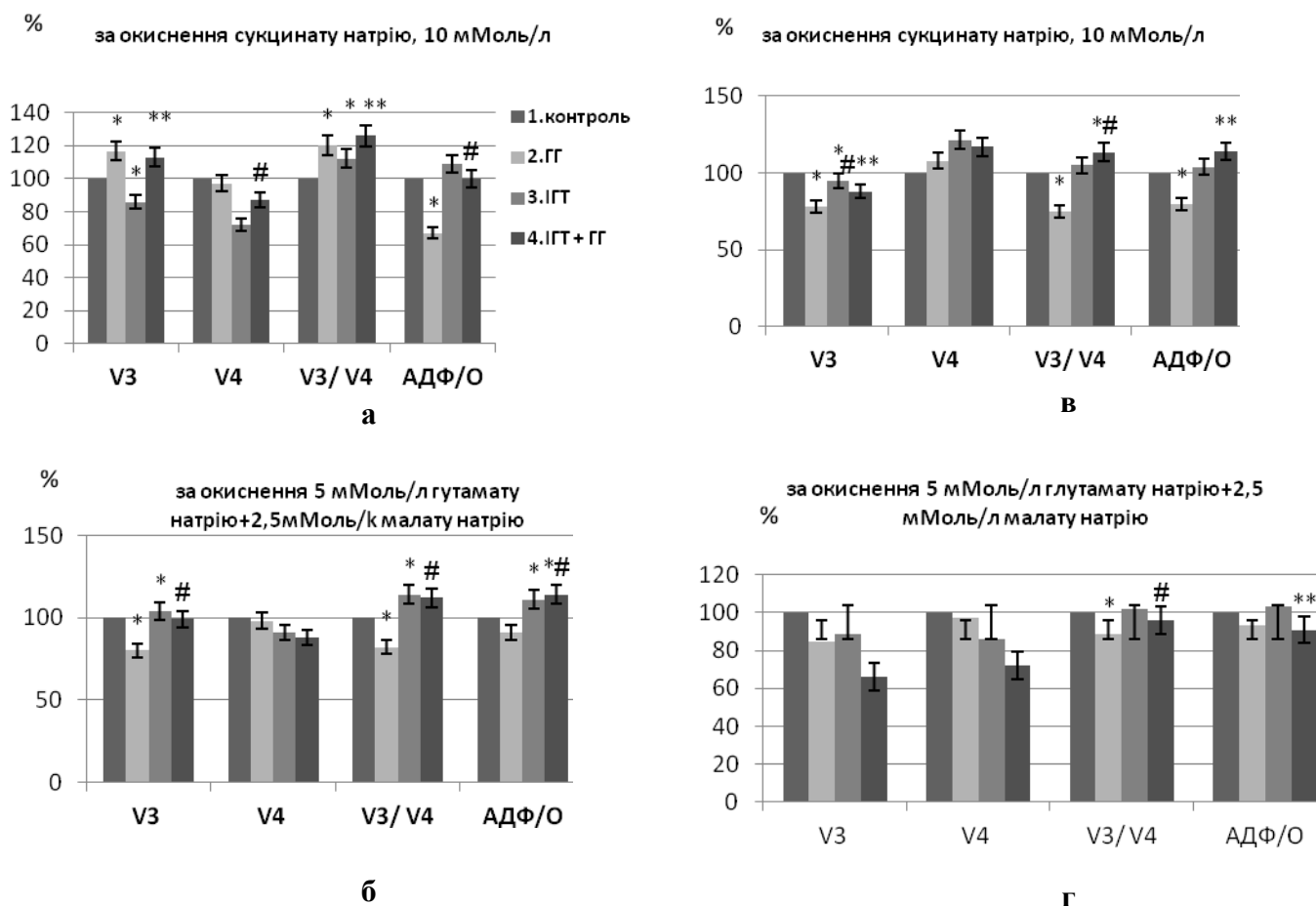


Рис. 6 - Показники окисного фосфорилування у Мх легень при ІГТ із 12 % O_2 в N_2 (а, б) та після тестуючої дії ГГ та при ІГТ із 7% O_2 в N_2 (в, г) та після тестуючої дії ГГ. * - відмінності достовірні відносно контролю до ГГ ($p < 0,05$); # - відмінності достовірні відносно ГГ до ІГТ 12% O_2 + ГГ ($p < 0,05$); ** - відмінності достовірні відносно ІГТ 12% O_2 до ІГТ 12% O_2 + ГГ ($p < 0,05$).

Більш жорсткий режим ІГТ не впливав позитивно на регуляцію енергетичних процесів у Мх в обох досліджуваних органах (Рис 6 і 7 в, г). ГГ збільшувала внесок сукцинатооксидазного шляху окиснення, порівняно із НАД-оксидазним, у загальний потік електронів дихального ланцюга, оскільки перший є менш чутливим до дефіциту кисню (Lukyanova 2015). Зменшення PO_2 за таких умов супроводжувалося пригніченням інтенсивності окиснення НАД-залежних субстратів. ГГ, застосована на тлі ІГТ із 12 % O_2 в N_2 , викликала активацію сукцинатооксидазного шляху окиснення, а адаптивні механізми енергетичного забезпечення полягали у збільшенні швидкості фосфорилуючого дихання, спряження дихання із фосфорилуванням та ефективності фосфорилування при НАД-оксидазному шляху окиснення у міокарді і легенях.

Тестуючий вплив ГГ, проведений на тлі ІГТ із 7 % O_2 в N_2 , не призводив до виражених адаптивних перебудов енергетичного обміну Мх легень і міокарду, спрямованих на підвищення ефективності роботи дихального ланцюга при окисненні як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів, хоча при цьому відмічалася перевага сукцинатооксидазного шляху окиснення.

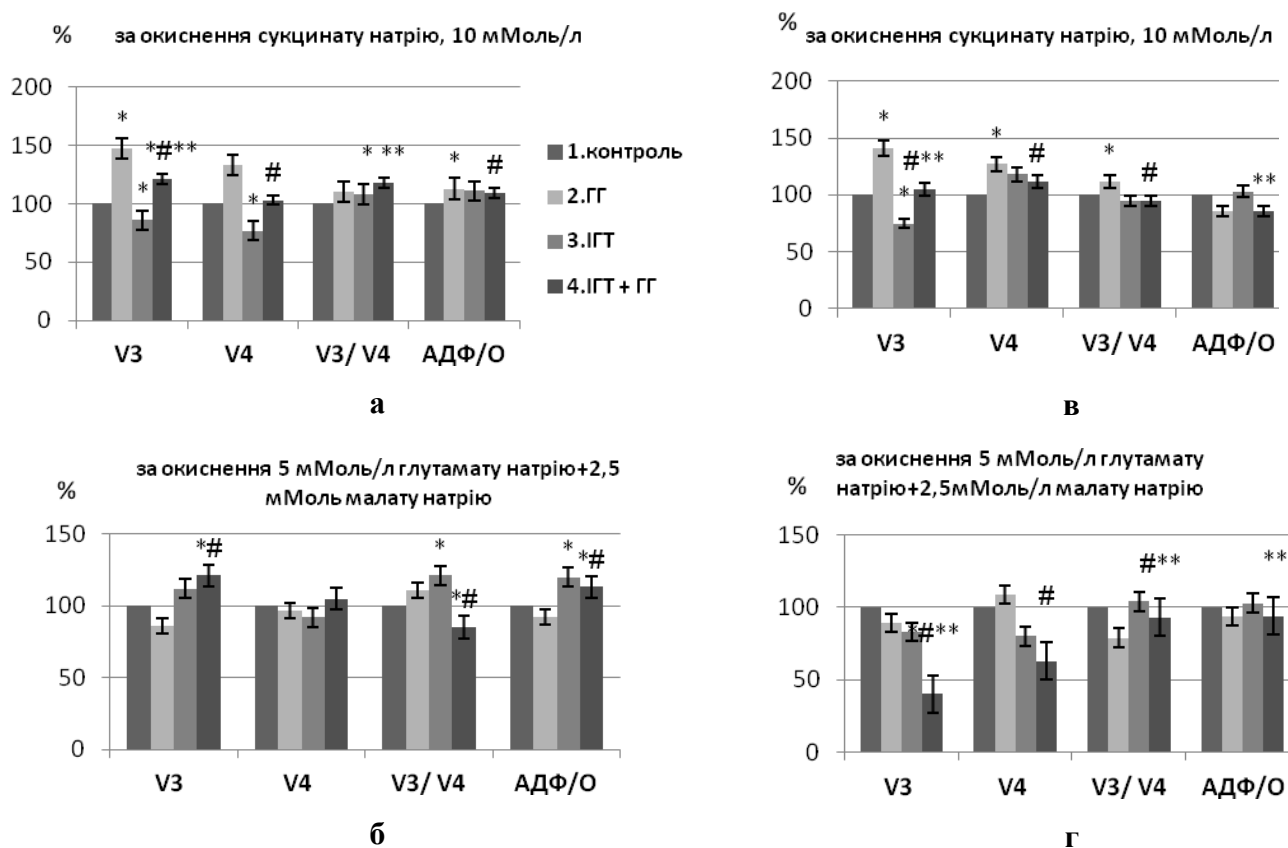


Рис.7. Показники окисного фосфорилування у Мх серця при ІГТ із 12 % O_2 в N_2 (а, б) і після тестуючої дії ГГ та при ІГТ із 7 % O_2 в N_2 (в, г) і після тестуючої дії ГГ. * - відмінності достовірні відносно контролю до ГГ ($p < 0,05$); # - відмінності достовірні відносно ГГ до ІГТ 12% O_2 + ГГ ($p < 0,05$); ** - відмінності достовірні відносно ІГТ 12% O_2 до ІГТ 12% O_2 + ГГ ($p < 0,05$).

Підсумовуючи все вище сказане, можна зробити висновок, що Мх є не тільки мішенню гіпоксії, а і важливою ланкою адаптаційних змін при різних режимах ІГТ. Показано, що ІГТ активує динамічні процеси в Мх, їх біогенез, посилює гетерогенність мітохондріальної популяції, змінює енергетичний метаболізм Мх та рівні експресії мРНК NRF-1. Проведення додаткового тестуючого гіпоксичного впливу дозволило встановити, що під час ІГТ із помірною гіпоксичною складовою адаптивні механізми обумовлювали суттєве зниження ступеня деструктивного впливу гострого гіпоксичного навантаження, тоді як ГГ, застосована на тлі ІГТ із 7% O_2 в N_2 , не виявила виражених адаптивних перебудов, хоча і дозволяла підтримувати деякі функціональні показники Мх на рівні контрольних значень. Отримані результати мають вагомим практичне значення для розуміння механізмів формування адаптивної відповіді основних органів, що відповідають за забезпечення організму киснем (на клітинному, мітохондріальному та молекулярно-генетичному рівні), на різні режими ІГТ та можуть слугувати основою розробки оптимального нефармакологічного терапевтичного методу профілактики і корекції гіпоксичних станів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведені експериментальні дані щодо особливостей морфо-функціональних змін Мх легень і міокарду при двох режимах інтервальних гіпоксичних тренувань і застосування гострої тяжкої гіпоксії в якості тестуючого впливу для виявлення механізмів, що лежать в основі адаптації мітохондріального апарату до гіпоксії під впливом ІГТ.

1. При застосуванні досліджуваних режимів інтервального гіпоксичного тренування відбуваються органоспецифічні зміни структурно-динамічних і функціональних параметрів мітохондріального апарату легень і міокарду як адаптивного (конструктивного), так і пошкоджуючого (деструктивного) характеру.

2. Режим ІГТ із помірною гіпоксичною складовою (12% O₂ в N₂) призводить до переваги в мітохондріальному апараті легень і міокарду виражених адаптивних перебудов ультраструктури, динаміки та функціональних властивостей, що направлені на покращення умов і механізмів споживання кисню тканиною і проявляються в: зростанні кількості Мх (легені - в 2,5рази, міокард - в 2 рази порівняно з контролем) та появи юних органел; збільшенні площі Мх мембран (легені - в 1,4 рази, міокард - 2 рази порівняно з контролем) та перебудові крист у більш енергізовану форму; міграції Мх в зони гіпоксичного пошкодження; у динамічних змінах, направлених на репарацію пошкоджених Мх; зростанні ефективності фосфорилування та спряженості дихання з фосфорилуванням при окисненні НАД-залежних субстратів.

3. Дія ІГТ з більш жорсткою гіпоксичною складовою (7% O₂ в N₂) призводить до виражених деструктивних змін Мх легень та міокарду: часткової чи повної вакуолізації органел, їх мієлінізації, розрідженні внутрішньої та, подекуди, розриву зовнішньої мембрани, збільшення гетерогенності мітохондріальної популяції (серед якої з'являлися Мх з „некласичними” формами) переваги процесів роз'єднання (fission) над процесами злиття (fusion) Мх. Адаптивні зміни Мх при цьому режимі ІГТ полягають в зростанні загальної площі мембран Мх (легені - 1,6 рази; міокард - 1,7 рази порівняно з контролем), міграції СС Мх у «ворсинки сарколеми», а ІМФ Мх до навколядерної зони, що дозволяє Мх обох досліджуваних тканин забезпечувати їх енергетичні потреби на рівні контрольних значень.

4. Зміни структурно-динамічних властивостей Мх є важливою ланкою адаптації до гіпоксії під впливом ІГТ. При помірних гіпоксичних навантаженнях (ІГТ із 12% O₂ в N₂) у легенях переважають процеси злиття Мх (про що свідчить збільшення повздовжнього діаметру Мх, їх гуртування одна біля одної), тоді як у міокарді виражені як процеси злиття (гуртування СС Мх, гуртування неушкоджених органел біля Мх з вираженими ознаками деструкції або їх розміщення у місцях лізису органел, утворення Мх розгалуженої «некласичної» форми), так і дроблення (утворення Мх невеликого розміру, що розміщуються відокремлено). При ІГТ із 7% O₂ в N₂ означений спектр змін у мітохондріальному апараті зберігався, однак в тканинах обох органів зростала кількість як органел з ознаками незворотного набряку та деструкції, так і з проявами мітоптозу.

5. Тестуюча жорстка гіпоксія, яка використовувалася для оцінки ефективності

ІГТ, показала, що деструктивні зміни мітохондріального апарату та мітохондріальна дисфункція, характерні для впливу ІГТ, менш виражені в міокарді і легенях на тлі попередньо проведеного ІГТ 12% O₂ в N₂. Головними механізмами, що забезпечують ефективність такого режиму ІГТ є: зсув динамічних процесів у бік злиття Мх у обох досліджуваних органах; зростання інтенсивності біогенезу Мх особливо у ІМФ Мх серця (на 20% порівняно із ІГТ 12% O₂ в N₂); високий рівень спряження дихання з фосфорилуванням в обох тканинах.

6. Підвищення рівнів експресії мРНК NRF-1 на тлі обох застосованих режимів ІГТ свідчить про інтенсифікацію процесів мітохондріального біогенезу, більш виражену в міокарді. Високі рівні експресії досліджуваного гену спостерігаються при ІГТ з більш жорсткою гіпоксичною компонентою і відбуваються на фоні виражених деструктивних змін мітохондріального апарату.

7. Структурно-динамічні, функціональні і генетичні зміни Мх легень і міокарду під впливом ІГТ мають виражений органоспецифічний характер: показана більша вираженість структурних адаптивних можливостей мітохондріального апарату міокарду, порівняно з Мх легень. На функціональному рівні це супроводжується перебудовою енергетичного метаболізму шляхом посилення НАД-залежного окиснення зі зменшенням інтенсивності сукцинатоксидазного шляху окислення.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Болгова Т.В. Порівняльний аналіз адаптивного впливу двох режимів інтервального гіпоксичного тренування на морфо-функціональний стан мітохондрій легень та міокарду / Т.В.Болгова, К.В.Розова, В.І Носар, І.М Маньковська // Вісник проблем біології і медицини. - 2016 - Вип.3, Том 1(131). - С.271-278. *(Особисто дисертантом проведено збір первинних даних, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка до друку).*

2. Болгова Т.В. Морфометричний аналіз стану мітохондріального апарату легень і міокарда при різних режимах інтервальної гіпоксії / Т.В.Болгова, М.Г.Дубова, К.В.Розова, І.М. Маньковська // Вісник морфології - 2014 - Т.20 №2. - С.352-357. *(Особисто дисертантом проведено збір первинних даних, аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка до друку).*

3. Болгова Т.В. Деякі механізми морфофункціональних змін в тканині легень при гіпоксичних впливах різного генезу / К.В.Розова, Т.В. Болгова, І.М.Маньковська // Вісник наукових досліджень - 2009 - №3 - С.13-18. *(Особистий внесок здобувана: участь у проведенні морфо- і стереометричного дослідження, аналізі літератури та інтерпретації отриманих результатів, оформленні статті).*

4. Болгова Т.В. Генетично детерміновані органоспецифічні зміни ультраструктури тканин організму при різних екзогенних впливах / К.В.Розова, Т.В.Болгова, Л.Г.Горяна, М.Г.Дубова, І.М. Маньковська // Фізіологічний журнал - 2007 - Т.53 №2 - С.8-14. *(Особистий внесок здобувана: участь у проведенні морфо- і стереометричного дослідження, аналізі літератури та інтерпретації отриманих результатів, оформленні статті).*

5. Болгова Т.В. Ультраструктурные особенности деструкции и морфогенеза митохондрий в тканях организма при гипоксии различного генеза / К.В.Розова, Т.В.Трепацька (Болгова) // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. - 2006. - Т.142, часть 3. - С.126-129. (*Особистий внесок здобувача: участь у проведенні морфо- і стереометричного дослідження, аналізі літератури та інтерпретації отриманих результатів, оформленні статті*).

6. Болгова Т.В. Взаємозв'язок тканинного дихання та деяких стереометричних характеристик митохондрий у тканині легень при різних модифікаціях гіпоксичної гіпоксії / К.В.Розова, А.І.Назаренко, Т. І.Таволжанова, Т.В.Трепацька (Болгова), М.О.Черкесова // Фізіологічний журнал - 2005 - Т.51 №2. - С.25-29. (*Особистий внесок здобувача: участь у проведенні морфо- і стереометричного дослідження, аналізі літератури та інтерпретації отриманих результатів*).

Тези:

1. Болгова Т.В. Особливості ультраструктури та біогенезу митохондрий у легнях щурів при різних режимах інтервальної гіпоксії / Т.В.Болгова, Т.І.Древицька, Е.К.Розова, І.М. Маньковська // Матеріали Всеукраїнської науково- практичної конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації» - 2015 - С.8.

2. Болгова Т.В. Особливості ультраструктури митохондрий легень і міокарду при різних режимах інтервальної гіпоксії / Т.В.Болгова // Матеріали ХІХ з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 90-ти річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка Фізіологічний журнал - 2014 - Т.60 №3. - С.102-103.

3. Болгова Т.В. Влияние интервальной гипоксической тренировки на ультраструктуру митохондрий легких и показателей их функционально - метаболического состояния / Т.В.Болгова, К.В.Розова, В.И.Носарь, И.Н.Маньковская // Сб. тезисов научно-практической конференции с международным участием «Реабилитация и профилактика»- 2014 - С. 45-47.

4. Болгова Т.В. Влияние и отдаленные последствия интервальных гипоксических тренировок на структуру и функцию ткани легких и миокарда при дополнительных воздействиях на организм / К.В.Розова, Т.В.Болгова // Сб. тезисов научно-практической конференции с международным участием «Реабилитация и профилактика»- 2013 - С. 222.

5. Болгова Т.В. Экспрессия мРНК транскрипционного нуклеарного фактора N¹ в тканях крыс при разных режимах интервально-гипоксических тренировок / И.Н.Маньковская, В.Є.Досенко, Т.В.Болгова, Т.И. Древицкая // Научная конференция с международным участием «Высокогорная гипоксия и геном», Терскол, Кабардино-Балкария, Россия, Фізіологічний журнал- 2008. - Т.54, № 4- С.78-79.

6. Болгова Т.В. Деякі морфологічні особливості адаптації кисень- транспортної системи до гіпоксичної гіпоксії / К.В. Розова, Т.В.Трепацька (Болгова), Т.І.Таволжанова, М.Г.Дубова, Д.Г. Вишневський // Фізіологічний журнал - 2006 - Т.52 №2. - С.154-155.

АНОТАЦІЯ

Болгова Т.В. Структурно-динамічні та функціональні особливості мітохондрій легень і серця при різних режимах інтервальних гіпоксичних тренувань. - На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.013 - фізіологія людини і тварин. - Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, 2016.

Вивчені морфо-функціональні особливості Мх легень і серця при двох режимах інтервальних гіпоксичних тренувань і застосування гострої тяжкої гіпоксії в якості тестуючого впливу для виявлення механізмів, що лежать в основі адаптації мітохондріального апарату до гіпоксії під впливом ІГТ.

Отримані результати виявили, що при ІГТ відбуваються органоспецифічні зміни структурно-динамічних і функціональних параметрів мітохондріального апарату легень і серця як адаптивного (конструктивного), так і пошкоджуючого (деструктивного) характеру. ІГТ із помірною гіпоксичною складовою (12% O₂ в N₂) призводить до переваги в мітохондріальному апараті легень і міокарду виражених адаптивних перебудов ультраструктури, динаміки та функціональних властивостей, що спрямовані на покращення умов і механізмів споживання кисню тканиною і проявляються в: зростанні кількості Мх та появі юних органел; збільшенні площі їх мембран; перебудові крист у більш енергетично ємну форму; міграції Мх в зони гіпоксичного пошкодження та у динамічних змінах, направлених на репарацію пошкоджених Мх; зростанні ефективності фосфорилування та спряженості дихання з фосфорилуванням при окисненні НАД-залежних субстратів.

ІГТ з більш жорсткою гіпоксичною складовою (7% O₂ в N₂) призводили до виражених деструктивних змін Мх в обох органах: часткової чи повної вакуолізації органел, їх мієлінізації, розрідження внутрішньої та, подекуди, розриву зовнішньої мембрани, збільшення гетерогенності мітохондріальної популяції, серед якої з'являлися Мх з „некласичними” формами, переваги процесів роз'єднання (fission) над процесами злиття (fusion) Мх. Адаптивні зміни Мх при цьому режимі ІГТ полягали в зростанні загальної площі мембран Мх, міграції СС Мх у «ворсинки сарколеми», а ІМФ Мх до навколоядерної зони, що дозволяло Мх обох досліджуваних органів забезпечувати їх енергетичні потреби на рівні контрольних значень. Підвищення рівнів експресії мРНК NRF-1 на тлі обох застосованих режимів ІГТ свідчить про інтенсифікацію процесів мітохондріального біогенезу, більш виражену в серці. Надмірно високі рівні експресії спостерігалися при ІГТ з більш жорсткою гіпоксичною компонентою і відбувалися на фоні виражених деструктивних змін мітохондріального апарату. Дія жорсткої гіпоксії, яка використовувалася для оцінки ефективності ІГТ, проявила, що головними механізмами, що забезпечують таку ефективність ІГТ, є: збільшення площі мембран Мх, зсув динамічних процесів у бік злиття цих мембран, високий рівень спряженості дихання з фосфорилуванням, зростання інтенсивності біогенезу Мх.

Ключові слова: Мітохондрії, інтервальні гіпоксичні тренування, гостра гіпоксія, легені, серце.

АННОТАЦИЯ

Болгова Т.В. Структурно-динамические и функциональные особенности митохондрий легких и сердца при разных режимах интервальных гипоксических тренировок. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.013 - физиология человека и животных. - Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена изучению структурно-динамических особенностей митохондрий (Мх) легких и сердца после применения двух режимов интервальных гипоксических тренировок (ИГТ) с применением острой гипоксии (ОГ) в качестве тестирующего влияния для определения механизмов, которые лежат в основе адаптации Мх к гипоксии под воздействием ИГТ.

Полученные результаты показали, что при ИГТ происходят органоспецифические изменения структурно-динамических и функциональных параметров Мх легких и сердца как адаптивного, так и деструктивного характера. ИГТ с умеренной гипоксической компонентой (12% O₂ в N₂) приводит к преимуществу адаптивных перестроек митохондриального аппарата легких и сердца, которые направлены на оптимизацию условий и механизмов потребления кислорода и проявляются в увеличении количества Мх, появлении юных органелл, увеличении площади их мембран, перестройке крист в более энергоемкую форму, миграции Мх в зоны гипоксического повреждения и в динамических изменениях, направленных на репарацию поврежденных Мх, увеличении эффективности фосфорилирования и сопряженности дыхания с форсфорилирование при окислении НАД-зависимых субстратов.

ИГТ с более жесткой гипоксической составляющей (7% O₂ в N₂) приводили к выраженным деструктивным изменениям митохондриального аппарата в обоих органах: частичной или полной вакуолизации органелл, их миелинизации, лизиса внутренней, а, местами, и внешней мембран Мх, увеличении гетерогенности митохондриальной популяции. Адаптивные изменения при этом режиме ИГТ заключались в увеличении *Sitôt*, миграции СС Мх в «ворсинки сарколемы», а ИМФ Мх к околядерноядерной зоне, что позволяло Мх обоих органов обеспечивать их энергетические потребности на уровне контрольных показателей.

Увеличение уровней экспрессии мРНК NRF-1 на фоне обоих режимов ИГТ указывает на интенсификацию процессов митохондриального биогенеза, более выраженную в сердце. Высокие уровни экспрессии этого гена мы наблюдали после ИГТ с более жесткой гипоксической компонентой. Они сопровождалась выраженными деструктивными изменениями Мх.

Тестирующее воздействие ОГ показало, что основными механизмами обеспечивающими эффективность ИГТ являлись: увеличение площади мембран Мх, сдвиг динамических процессов в сторону слияния Мх, высокий уровень сопряженности дыхания с фосфорилированием, увеличение интенсивности биогенеза Мх.

Ключевые слова: Митохондрии, интервальные гипоксические тренировки, острая гипоксия, легкие, сердце.

SUMMARY

Bolgova T.V. Structural, dynamic and functional features of lung and heart mitochondria under different modes of intermittent hypoxic training. - Manuscript.

Thesis for PhD degree by speciality 03.00.013 - human and animal physiology. - Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2016.

There was studied morpho-functional peculiarities of lung and heart mitochondria (M) of rats after two intermittent hypoxic training (IHT) regimen with using of acute hypoxia (AH) as the testing influence for the exposure of mechanisms which are responsible for mitochondrial adaptation to hypoxia.

The obtained results discovered that IHT led to organospecific morpho-functional changes in lung and heart M of constructive (adaptive) and destructive character. IHT with moderate hypoxic component (12% O₂ in N₂) results in advantage of adaptive changes in lung and heart M which were directed to the improvement of terms and mechanisms of oxygen consumption. These changes expressed in: the rise of M quantity and the appearance of young organelles; an increase of area of mitochondrial membranes; the cristae rebuilding in more power capacious form; M migration toward zones of hypoxic damage; dynamic changes directed to reparation of damaged M; an increase of phosphorylation efficiency and coupling of breathing with phosphorylation under NAD- dependent substrates oxidation.

IHT with more severe hypoxic component (7% O₂ in N₂) led to the expressed destructive changes of M in both organs: partial or complete vacuolization of organelles; the appearance of mielinized M; dilution of internal and, here and there, break of external mitochondrial membranes; an increase in heterogeneity of mitochondrial population; advantage of mitochondrial fission above the processes of fusion. The adaptive changes of M at this mode of IHT consisted in the rise of general area of mitochondrial membranes; migration of subsarcolemmal M toward the sarcolemma invagination and intramiofibrillar M - to the perinuclear space. It allowed M of both organs to provide their power demands at the level of control values.

Increased levels of mRNA NRF-1 expression on a background of both applied modes of IHT testified for intensification of mitochondrial biogenesis, more shown in heart. Very high expression levels of this gene were observed after IHT with more severe hypoxic component and took place on a background of the expressed destructive changes in M.

AH which was used for the estimation of efficiency of IHT showed, that the leading mechanisms provided such efficiency IHT are: increased area of M membranes; change of dynamic processes toward fusion of these membranes; high level of the breathing with phosphorylation coupling; the rise of mitochondrial biogenesis intensity.

Key words: mitochondria, intermittent hypoxic trainings, lung, heart.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГБ – аеро-гематичний бар'єр

АДФ – аденозиндифосфат

АДФ/О – коефіцієнт ефективності фосфорилування

АФК – активні форми кисню

ГГ – гостра гіпоксія

ДЛ – дихальний ланцюг

ІГТ – інтервальне гіпоксичне тренування

мРНК – матрична рибосомальна нуклеїнова кислота

Мх – мітохондрії

ІМФ Мх – інтраміофібрилярні мітохондрії

СС Мх – субсарколемальні мітохондрії

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

СК – сукцинат натрію

NRF-1 – нуклеарний респіраторний фактор

Sitot – сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму