

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

*На правах рукопису*

УДК 612.233+612.176:577.151.6

**Болгова Тетяна Вікторівна**

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

**03.00.13-фізіологія людини і тварин**

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:  
завідувач відділу по вивченню  
гіпоксичних станів, доктор медичних  
наук, професор  
***Маньковська І.М.***

**Київ – 2016**

## ЗМІСТ

	стор.
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО РОЛЬ МІТОХОНДРІЙ У ФОРМУВАННІ АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ ДО ГІПОКСІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) .....	13
1.1. Мітохондрії – ключові органели клітинного метаболізму: структура, функції, динаміка, протеоміка, біогенез.....	13
1.2. Роль мітохондрій у розвитку тканинної гіпоксії та формуванні адаптивної відповіді на гіпоксичні стимули.....	23
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	32
2.1. Матеріали та методи дослідження.....	32
2.2. Електронно-мікроскопічне дослідження з морфо - та стереометричним аналізом.....	34
2.3. Дослідження експресії мРНК NRF-1.....	36
2.4. Визначення функціонального стану мітохондрій.....	39
РОЗДІЛ 3. ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АДАПТИВНОГО ВПЛИВУ ДВОХ РЕЖИМІВ ІГТ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ЛЕГЕНЬ І СЕРЦЯ.....	41
3.1. Морфо - та стереометричні характеристики мітохондрій в тканинах легень та серця .....	45
3.2. Рівні експресії мРНК NRF-1 в тканинах легень та серця .....	63
3.3. Зміни дихання і фосфорилування у мітохондріях в тканинах легень та серця .....	65
РОЗДІЛ 4. ТЕСТУЮЧЕ ГІПОКСИЧНЕ НАВАНТАЖЕННЯ ЯК ФАКТОР ВИЯВЛЕННЯ ЯКОСТІ АДАПТИВНИХ ЗМІН МІТОХОНДРІАЛЬНОГО АПАРАТУ, СФОРМОВАНИХ ПІД ЧАС ІГТ.....	72
4.1. Морфо- та стереометричні характеристики мітохондрій в тканинах легень та серця при тестуючому гіпоксичному	

навантаженні .....	73
4.2.Рівні експресії мРНК NRF-1 в тканинах легень та серця при тестуючому гіпоксичному навантаженні.....	96
4.3.Зміни дихання і фосфорилювання у мітохондріях в тканинах легень та серця при тестуючому гіпоксичному навантаженні .....	98
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	108
ВИСНОВКИ.....	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	121

## **ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ТА ТЕРМІНІВ**

АГБ – аеро-гематичний бар'єр

АДФ – аденозиндифосфат

АДФ/О – коефіцієнт ефективності фосфорилювання

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

## ВСТУП

**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 [22]. Розвиток гіпоксичного стану характеризується каскадом адаптивних (чи дезадаптивних) змін, котрі розвиваються як на органному, так і на молекулярному рівнях організації живої матерії [27]. 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 [1, 8, 22, 24, 54, 122]. Отриманий «адаптивний резерв», в подальшому, можна використовувати для попередження та корекції гіпоксичних станів різного генезу [1]. Прикладом такого використання саногенного ефекту гіпоксії [3] ) 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 [4, 15, 19, 27, 41, 46, 50, 81].

Технологія методу ІГТ була розроблена ще у кінці 70-років ХХ століття Р.Б.Стрелковим і А.Я.Чижовим [15, 48]. На сьогодні, доведена можливість підвищення фізичної, інтелектуальної, емоційної витривалості та накопичений значний досвід профілактики і лікування низки захворювань і патологічних станів за допомогою ІГТ [12, 97, 100, 101, 102]. 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 [133], ступінь якої прямо залежить від вмісту кисню у гіпоксичній суміші

газів, тривалості епізодів гіпоксія/нормоксія [26]. 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 [26, 90]. Відповідь на гіпоксичний стимул носить виражений органоспецифічний характер [31], 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 [128, 159], завдяки унікальній будові їх мембран, наявності власного геному, здатності до руху (процеси злиття-роз'єднання) та домінуючій ролі у клітинному метаболізмі [65, 116, 117, 151, 156, 173]. Низка досліджень доводить, що гіпоксичний стимул ініціює каскад структурно-динамічних [65, 151] та функціональних [116, 117] змін Мх, призводить до модуляції інтенсивності їх біогенезу [156, 173]. Проблема «Мх і гіпоксія» була і залишається центральною в дослідженнях розвитку гіпоксичних станів різного генезу [23, 24, 26, 29, 30, 31, 33, 35, 37, 39, 54, 83, 93, 117, 122, 159, 178], їх профілактики і корекції [55, 80, 81, 84, 85, 97, 98, 102, 116, 119, 126, 162, 184]. 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, 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%  $O_2$  в  $N_2$  дає можливість окреслити межі адаптивних можливостей організму як на системному, так і на тканинному рівні [24, 26]. 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% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> та 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> та 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> 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 тканині легень та 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%  $O_2$  в  $N_2$  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%  $O_2$  в  $N_2$  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%  $O_2$ . 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, вказуює 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

жорскою 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.

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО РОЛЬ МІТОХОНДРІЙ У ФОРМУВАННІ АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ ДО ГІПОКСІЇ

#### 1.1. Мітохондрії – ключові органели клітинного метаболізму:структура, функції, динаміка, протеоміка, біогенез

З моменту відкриття Альтманом біобластів і по сьогоднішній день вивчення організації і функції Мх і досі залишається актуальним, оскільки вони відіграють ключову роль у енергетичному та іонному гомеостазисі, метаболізмі, сигнальних процесах, диференціації та клітинній загибелі [70, 87, 94, 137, 138] .

Вже чітко відомо, що дисфункція Мх і порушена регуляція їх гомеостазису грає провідну роль у патогенезі раку, нейродегенеративних хворобах та при старінні [65, 109]. Більш того, дисфункція Мх, яка спричинена мутацією генів, що кодують компоненти цих органел, виділяється в окремий тип патології - мітохондріальні хвороби [72, 106, 112, 128].

Регуляторна роль Мх у життєдіяльності організму визначається особливостями їх морфології (унікальною будовою мембран), наявністю власного геному, здатністю до динамічних змін (процеси fission та fusion) та розмноження, а також особливостями підтримки повноцінної популяції Мх у клітині.

Встановлено, що близько 90 % (залежно від тканини чи метаболічної активності організму) кисню у ссавців використовується Мх під час окисного фосфорилування. Мх включаються в кінцеву фазу клітинного катаболізму з ферментативним розщепленням карбогідратів, жирів і білків на молекули

пірувату, жирних і амінокислот відповідно. Далі в Мх проходить процес трансформації молекул на енергетичні еквіваленти: НАДН (нікотинамідаденіндинуклеотид) та/чи НАДН<sub>2</sub>, через окиснення чи цикл Кребса. Ці відновлені еквіваленти деградують, проходячи через білки дихального ланцюгу, у процесі реакцій окисного фосфорилування, в яких електрони, вивільнені в процесі окиснення НАДН та НАДН<sub>2</sub>, проходять крізь низку білків-переносників, що зосереджені на внутрішній мембрані Мх і утворюють електрон-транспортний ланцюг (ЕТЛ). ЕТЛ складається із чотирьох ензимних комплексів (комплекси I - IV) і двох мобільних електронних переносників (коензим Q і цитохром c). Ці комплекси складаються з білкових субодиниць, які кодовані як мітохондріальним геномом (мтДНК), так і в ядрі [21, 28, 36].

В присутності енергетичних субстратів - НАДН та НАДН<sub>2</sub> – трансфер електронів через комплекс I (чи II) до комплексу IV активує виштовхування протонів із матриксу у міжмембранний простір, чим створює електрохімічний градієнт протонів, який в кінцевому рахунку використовується АТФ-синтазою (тобто комплексом V) для виробництва АТФ. Цей градієнт має два компоненти: електричний та хімічний потенціали, а також може бути представлений як градієнт рН. За нормальних фізіологічних умов, продукування енергії в Мх варіює у двох станах: в основному, в стані 4 (V<sub>4</sub>) (дихання повільне і продукція АТФ мінімальна) та в стані 3 (V<sub>3</sub>) (дихання швидше і продукція АТФ є інтенсивною) [32, 63].

Також, система окисного фосфорилування залучена у процес генерації активних форм кисню (АФК, ROS-reactive oxygen species) [160]. Ці молекули розглядаються як важливий продукт енергетичного метаболізму Мх, що приймає участь у сигнальних процесах клітини [166]. Однак, надмірна продукція АФК є шкідливою для клітини [7, 179]. У більшості клітин, білки ЕТЛ вважаються головним сайтом продукції АФК із супероксиду, гідроген пероксиду та вільних радикалів [58, 61]. Комплекси I та II генерують

супероксид у матриксі Мх, комплекс III генерує супероксид аніон у так званому Qo сайті і вивільнює супероксид аніон як у інтермембранний простір, так і у матрикс. Комплекс IV не відмічений як такий, що продукує АФК. Та останні роботи Акопової зі співавторами [7] показали, що комплекс IV також активним продуцентом АФК. Встановлено, що вплив екзогенного цитохрому c на продукцію АФК у Мх зумовлений відкриттям мітохондріальної пори (МП) і, в подальшому, може створювати сприятливі умови передумови для подальшої індукції клітинного апоптозу і розвитку оксидативного стресу внаслідок надлишкової продукції АФК [132].

Рівень продукції АФК тісно пов'язаний із енергетичним станом Мх та залежить від величин мембранного потенціалу [69]. Також, рівень АФК різко підвищується у випадку інгібування ЕТЛ, що має місце, наприклад, при мітохондріальних захворюваннях [160].

Надмірна продукція АФК призводить до пошкодження мтДНК, змін у функціонуванні Мх, що відображаються в енергетичній депривації, порушенні окисно-відновних процесів і клітинній дисфункції та призводять до розвитку стану клітини, який називається оксидативним стресом [66, 177]. Щоб протидіяти цьому деструктивному процесу, клітина має мультифункціональні системи антиоксидантного захисту [61, 90], що складається із трьох типів ферментів: супероксиддисмутази (СОД), каталази і пероксидази (глутатіон пероксидази, в переважності) .

Внутрішня мембрана Мх має два компоненти: внутрішню поєднуючу мембрану (inner boundary membrane (IBM) та власну мембрану, що формує кристи (cristae membrane (CM) [77]. IBM розміщена ближче до зовнішньої мембрани Мх, тоді як CM утворює інвагінації – кристи [160], які пронизують мітохондріальний матрикс і поєднуються між собою іншими тубулярними структурами - crista junctions [67, 124]. Вважається, що вони є регулятором транспорту білків, ліпідів та розчинних метаболітів між окремими компартментами Мх [76].

Внутрішня мембрана Мх є динамічною структурою і може формувати різні типи крист (ламелярні, тубулярні, призматичні та ін.), залежно від метаболічного стану Мх (ортодоксального, енергізованого, енергізовано-скрученого та деенергізованого) чи тканинної приналежності цих органел, залежно від енергетичних потреб останніх [37, 38, 170, 183].

За формування крист у Мх відповідає Mitofilin/MINOS1 (mitochondrial inner membrane organizing system) - білковий комплекс, який знаходиться на внутрішній мембрані Мх і. Інгібування мітофіліну відображається на фрагментації Мх, дезорганізації крист, підвищує вивільнення цитохрому с. Вважається, що саме мітофілін у комплексі з MINOS1 є ключовою ланкою, яка контролює морфологію крист, формування *crista junctions* у ссавців [124]

Та все ж деталі механізму утворення і регуляції форми крист залишаються до кінця не вивченими. Так, Song DH, Park J на різних моделях показали, що локальний градієнт рН впливає на морфологію крист [77]. В цій роботі вони обґрунтовують гіпотезу про те, що тубулярний тип крист може формуватися і регулюватися локальним градієнтом рН. Вони показали, що діаметр крист також підконтрольний цьому градієнту і енергетично вигідним є перпендикулярний до повздожньої осі Мх ріст крист.

Здатність Мх зливатися (*fusion* – англ.) і ділитися на більш дрібні (*fission*) та розмножуватися шляхом поділу чи біогенезу - є важливими ланками як у збереженні функціонування популяції Мх [62, 73, 75, 91, 176], так і у підтримці гомеостазу клітини та формуванні адаптивної відповіді [45]. Так, процес злиття [148] Мх сприяє обміну внутрішньомітохондріальним вмістом, репарації мітохондріальної ДНК, доставці необхідних метаболітів та комплементції білків. Процес розділення Мх [147] забезпечує рівномірний розподіл мітохондріальної популяції між дочірніми клітинами під час поділу клітини. На кінець, процес *fission* сприяє ізоляції пошкоджених сегментів Мх із їх подальшою утилізацією аутофагосою [180]. Коли ці протективні механізми пошкоджуються,



розділення Мх сприяє розвитку апоптозу [103, 123, 169].

Морфологія Мх контролюється класом ГТФаз, що розміщені як на внутрішній так і на зовнішній мембранах Мх. Так, білок Opa1 (Optic atrophy 1) підтримує і контролює злиття мембран і цілісність крист, тоді як злиття зовнішньої мембрани Мх підконтрольне двом мітофузинам (mitofusins) - Mfn1 та Mfn2 [62, 65].

Як і процеси злиття, так і процеси роз'єднання Мх, також підконтрольні ГТФазам. Так, Drp1 (dynamine related protein 1) – це динамін, присутній на поверхні мітохондріальної мембрани при роз'єднанні органели [103]. Хоча точний механізм вбудовування Drp1 до зовнішньої мітохондріальної мембрани залишається чисто гіпотетичним, вважається, що можливими молекулами, що вбудовують Drp1 до мембрани, є білки Mff та MiD49/51 і що саме Drp1-1 залежне роз'єднання Мх через MiD49/51 регулює ре моделювання крист під час апоптозу [74].

Біогенез Мх – це складний процес, в якому утворюються нові Мх у клітині [82, 87]. Біогенез Мх активується різноманітними чинниками під час клітинного стресу чи сигналів від навколишнього середовища. Підвищення мітохондріальної маси носить протективний характер і контролюється як мітохондріальним, так і ядерним геномами [156, 157].

Наявність власного геному - ще одна особливість Мх, що дозволяє вважати ці органели напівавтономними [28]. Більшість мітохондріальних білків кодується в ядерному геномі, тоді як у мтДНК задовано білки ЕТЛ та рРНК та тРНК. Мітохондріальний геном людини складається із кільцевої ДНК та кодує лише 37 генів (2 рРНК, 22 тРНК і 13 генів, що кодують субодиниці ЕТЛ). Всі інші білки Мх кодуються ядерним геномом і імпортуються у Мх.

Ключовими регуляторами біогенезу Мх –маркерами біогенезу- прийнято вважати: PGC -1 $\alpha$ , NRF-1 та NRF-2 та tfam (mitochondrial transcription factor A) [78, 79, 82]. PGC -1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated

receptor gamma) є транскрипційним коактиватором, який активує nuclear respiratory factor 2 (NRF-2) та разом із ним коактивує nuclear respiratory factor 1 (NRF1). Фактори NRF, в свою чергу, активують tfam, який відповідає за транскрипцію закодovаних у ядрі мітохондріальних білків – як структурних білків Мх, так і тих, що залучені у транскрипцію, трансляцію і репарацію ДНК Мх [154, 155, 174].

Більшість мітохондріальних білків синтезуються у цитозолі, транслокуються в органелу і направляються специфічними сортуючими шляхами. За останні 20 років більше 30-ти білків було ідентифіковано як такі, що грають ключову роль в імпорті їх у Мх. Оскільки більшість білків задовані у ядрі, механізм вибору необхідного білка (targeting) [145], його імпорту і правильної збірки існує для забезпечення коректного функціонування Мх.

Більшість попередників мітохондріальних білків використовують різноманітні шляхи імпорту до інших компартментів Мх. Попередники мітохондріальних білків, що транспортуються такими шляхами, не містять N-terminal послідовності, а несуть свою сигнальну інформацію між основними послідовностями (mature sequence) [106].

На сьогодні, відомі чотири мембранні транслокази. ТОМ (translocase of the outer membrane) – є універсальними воротами для всіх білків, що імпортується у Мх. Різноманітні білкові транспортні шляхи далі розгалужуються від неї. ТІМ (translocase of the inner membrane) сортує білки-попередники матриксу, РАМ (presequence translocase-associated motor) регулює роботу матриксного Hsp70 для проходження попередників у мітохондріальний матрикс. Накінець, САМ (sorting and assembly machinery), що розміщений на зовнішній мембрані, вбудовує  $\beta$ -barrel білки до зовнішньої мембрани. Всі ці процеси є інтегрально частиною біогенезу Мх [150, 156].

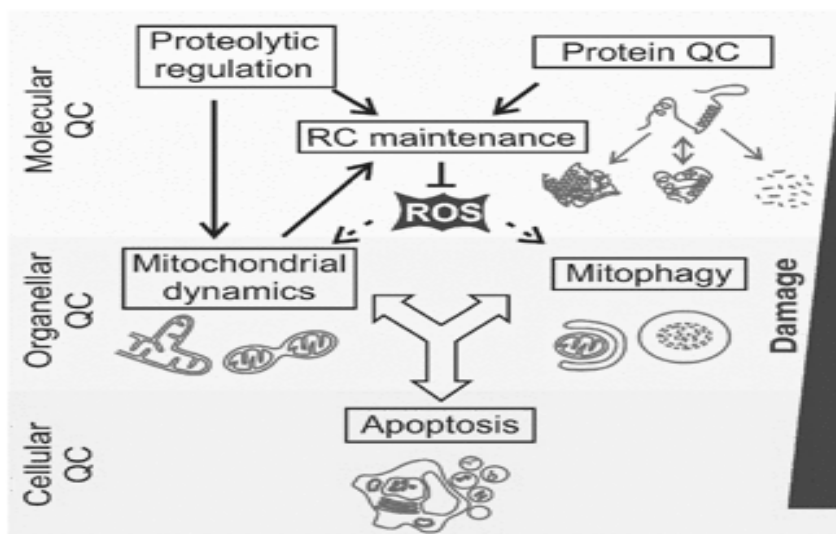
Вибіркова проникність Мх та наявність на внутрішній мембрані потенціал-чутливої мітохондріальної пори (МП, (mitochondrial permeability

transition pore, МРТР) забезпечує участь Мх в індукції апоптозу чи некрозу (залежно від функціонального стану клітини та дії патологічних чинників) [7]. Серед причин розвитку МП-залежної мітохондріальної дисфункції розрізняють: оксидативний стрес, навантаження кальцієм, порушення біосинтезу оксиду азоту (NO), виснаження енергетичних запасів клітини тощо [20, 58, 60].

Для збереження своєї цілісності, клітина має кілька механізмів підтримання «здорової» мітохондріальної популяції. Так, одна з ліній захисту – це протеолітична «система контролю якості білка» (protein quality control (QC) Мх (Рис.1.1 ) Шаперони та енергетично-залежні протеази контролюють згортання і збірку білків Мх і селективно видаляють надлишок чи пошкоджені білки із органели [109, 120].

Другою лінією захисту Мх є динамічна рівновага мітохондріальної популяції. Функціонування пошкоджених Мх може бути відновлено в процесі злиття із сусідніми інтактними Мх [75, 127]. Сильно пошкоджені Мх послаблюють процеси fusion і призводять до фрагментації Мх.

Фрагментовані Мх далі селективно –залежно від ступеня деструкції - знешкоджуються у процесі мітофагії [106]. Мітофагія запобігає вивільненню проапоптичних білків із пошкоджених Мх, чим пригнічує процес активації апоптозу [129].



**Рисунок 1.1** «Система контролю якості білку» містить протеази, які контролюють цілісність білків ДЛ та їх правильну збірку. Функціонування пошкоджених Мх може відновлюватися шляхом міжмітохондріального обміну матриксним вмістом у процесі злиття Мх. Сильно пошкоджені Мх фрагментуються і знешкоджуються у процесі мітофагії чи індукують апоптоз, вивільнюючи проапоптичні білки [109].

Ще до кінця не зрозуміло, яким чином пошкоджені Мх селективно видаляються, але є дані, які доводять, що дисфункція Мх сама по собі активує мітофагію. Також, було показано, що мітофагія залежить від процесу роз'єднання Мх. Пригнічення мітохондріального роз'єднання чи індукція злиття Мх пригнічує NO-залежну мітофагію [134].

Після роз'єднання Мх, прогресування мітофагії залежить від діяльності МП і може пригнічуватися її інгібіторами (наприклад, циклоспорином А чи гіперпродукцією антиапоптичного білку Bcl2) . Відкриття МП призводить до пошкодження внутрішньої мембрани Мх [7], вивільнення проапоптичних білків із міжмембранного простору та апоптозу, якщо Мх селективно не

утилізуються шляхом мітофагії [169].

Поряд із підтримкою клітинного гомеостазису, мітофагія також грає важливу роль у формуванні відповіді на клітинний стрес [135]. Залежно від енергетичних протреб клітини, мітофагія регулює кількість Мх [113], надмірну продукцію АФК шляхом відокремлення та утилізації «токсичних» та пошкоджених Мх, тим самим забезпечуючи баланс окисно-відновних процесів у клітині [168, 176].

Недавні дослідження демонструють, що зміна концентрації АФК індукує мітофагію, подібно процесу, що має місце при роз'єднанні Мх [129]. Також, автори цієї роботи показали, що dominant-negative variant фактора роз'єднання Мх Drp1 пригнічує мітофагію. Виходячи з цього, ймовірно, що мітохондріальні АФК та мітофагія взаєморегулюють один одного шляхом системи зворотнього зв'язку [160].

На початку 2000 рр. вийшли дві цікаві роботи Скулачова [164, 165], в яких він висвітлює фундаментальні аспекти суїциду Мх та вводить термін - мітоптоз. Мітоптоз відбувається, переважно, після падіння мембранного потенціалу, внаслідок порушення синтезу та доставки мітохондріальних білків ДЛ. Також, важливими тригерними механізмами мітоптозу є гіперпродукція АФК без зниження рівня АТФ. Дисфункція Мх є достатньою підставою для того, щоб Мх йшла шляхом «краще загинути, ніж бути неправим», вважає Скулачов [165]. Мітоптоз може здійснюватися кількома шляхами. Є мітоптоз внутрішньої мембрани, при якому деградують тільки внутрішній матрикс та кристи, тоді як зовнішня частина Мх залишається не пошкодженою. При мітоптозі зовнішньої мембрани від органели залишаються лише залишки набряклих крист. Далі, пошкоджені Мх можуть ставати аутофагосомами чи мітоптотичними тільцями [Lyamzaev KG 2008]. Під час мітоптозу зовнішньої мембрани, відбувається набряк та фрагментація крист, що призводить до конденсації Мх. Накінець, зовнішня мембрана Мх розривається, і везикулярні залишки крист виходять у цитоплазму. Під час

мітоптозу внутрішньої мембрани, зовнішня мембрана Мх залишається інтактною, матрикс Мх стає менш щільним, тоді як внутрішня мембрана втрачає регулярність крист, і, в кінцевому рахунку, деградує. Також, Скулачов виявив третій тип мітоптозу, при якому, Мх конденсується після попереднього набряку та везикулярної фрагментації крист, подібно до мітоптозу зовнішньої мембрани а потім Мх поглинається аутофагосою.

Таким чином, для підтримки біоенергетичного гомеостазису в клітині, безперечно важливим є контроль популяції Мх. Це здійснюється шляхом динамічних змін Мх апарату (процесів fusion-fission), змін їх кількості шляхом біогенезу, а також через утилізацію пошкоджених Мх за допомогою мітофагії та мітоптозу.

Мх регулюють три форми клітинної загибелі [103, 123, 169]: 1) апоптоз, зумовлений зовнішніми чинниками; 2) апоптоз, зумовлений внутрішніми чинниками та 3) некроз. Апоптоз, зумовлений зовнішніми чинниками, ініціюється через зв'язування з «рецепторами смерті»: TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) чи Fas. Це призводить до формування мультипотентного комплексу із каспази 8, рецептор-зв'язаного серин/треонін-протеїнкінази 1 (RIPK1) та Fas-асоційованого домену смерті (FADD - Fas-associated death domain), що, в свою чергу, через активацію каспази 8 індукуює апоптоз. Такий шлях індукції апоптозу також називається рецептор-смерті індукований апоптоз (death receptor induced apoptosis) і ініціюється Fas-лігандом (FasL), фактором некрозу пухлин ((TNF - tumor necrosis factor) чи TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) [Tait and Green, 2010]. Втрата мітохондрією цілісності внутрішньої мембрани розглядається як наслідок пошкодження ДНК чи стресу ендоплазматичного ретикулуму. Апоптоз, зумовлений внутрішніми чинниками, ініціюється зміною проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани. Відкриття мітохондріальної пори зумовлює вивільнення проапоптичних факторів (цитохрому c, AIF (apoptosis inducing factor), SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct

inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) ) до цитоплазми, які активують протеази і загибель клітини . За відсутності каспазної активності, клітина може загинути шляхом апоптозу чи некрозу. Некротичний шлях також ініціюється через TNFR1 та внутрішню мембрану Мх. Протягом цього процесу RIPK1 та RIPK3 взаємодіють із MLKL (mixed lineage kinase domain-like) та формують некрোসому. Така некросома є мультикомпонентним білковим комплексом, що пригнічує ANT (mitochondrial protein adenine nucleotide translocase), чим стимулює фрагментацію Мх.

Таким чином, унікальна будова і властивості мембран Мх, наявність власного геному визначають їх домінантну роль у: аеробному синтезі енергії, регуляції клітинного гомеостазису та індукції різних форм загибелі клітини. Пошук і розкриття нових механізмів функціонування мітохондріального апарату в експериментальних умовах дозволяє шукати нові шляхи корекції ряду патологічних станів. Одним із ключових чинників у розвитку останніх є зниження постачання тканин і органів киснем (чи порушення його утилізації в них). Проблема» «Мх і гіпоксія» була і залишається центральною в дослідженнях розвитку гіпоксичних станів різного генезу, їх профілактики і корекції, особливо при захворюваннях серцево-судинної та дихальної систем.

Одним із ключових чинників у розвитку останніх є зниження постачання тканин і органів киснем (чи порушення його утилізації в них). Проблема» «Мх і гіпоксія» була і залишається центральною в дослідженнях розвитку гіпоксичних станів різного генезу, їх профілактики і корекції.

## **1.2. Роль мітохондрій у розвитку тканинної гіпоксії та формуванні адаптивної відповіді на гіпоксичні стимули**

Гіпоксичні стани характеризують за походженням (екзогенна і ендогенна), характером і швидкістю розвитку, за ступенем важкості і за поширеністю [1]. Екзогенна гіпоксія пов'язана із зміною парціального тиску

кисню у газовій суміші, що вдихується. Ендогенну гіпоксію викликають порушення зовнішнього дихання, транспорту кисню кров'ю і тканинного дихання. До екзогенної гіпоксії належать гіпоксична і гіпероксична гіпоксія, а до ендогенної — респіраторна, гемічна, циркуляторна, тканинна гіпоксія [8]. Така класифікація гіпоксичних станів є досить умовною і, як правило, гіпоксичний стан розвивається внаслідок різноманітних причин і є змішаним. Гіпоксія на тканинному рівні характеризується або зниженням здатності клітин використовувати кисень для біологічного окислення (первинна), або меншою кількістю кисню, що з тієї чи іншої причини надходить до мітохондрій (вторинна) [18].

Основними стадіями відповіді на гіпоксію на ультраструктурному рівні є компенсаторна стадія, стадія зворотніх змін і стадія незворотніх змін [51]. *Компенсаторна стадія*, яка триває біля 15 хвилин, характеризується падінням рівня макроергів (АТФ, КрФ), накопиченням АДФ, АМФ і Кр, активацією аденілатциклази. Так, внаслідок накопичення Кр виключається кальцієва помпа; активація аденілатциклази призводить до збільшення проникності плазмалеми для іонів кальцію, активується гліколіз і відбувається стабілізація лізосом. В той же час, зміни енергетичного обміну призводять до зупинки реакцій анаболізму (в тому числі, і ресинтезу фосфоліпідів). Як результат, спостерігається підвищення концентрації кальцію в цитозолі. Морфологічні зміни клітинних структур у цьому періоді незначні, тільки у матриксі мітохондрій спостерігається розпад кристалоїдів, а реоксигенація на даному етапі призводить до відновлення структури і функції клітини. При продовженні гіпоксії, клітина переходить у *стадію зворотніх змін*, яка характеризується активацією фосфоліпаз (мітохондріальної  $A_2$  і  $A_1$  і  $A_2$  плазмалеми), що призводить до гідролізу фосфоліпідів мембран. Знижується ефективність окисного фосфорилування через роз'єднання і інгібування переносу електронів у дихальному ланцюгу (внаслідок модифікації внутрішньої мембрани). Паралельно із цим, спостерігається зниження  $Ca^{2+}$ —



акумулюючої здатності мітохондрій. В цитозолі продовжує знижуватися рівень макроергів, збільшується концентрація продуктів гідролізу і знижується рН. В кінці цього етапу, відмічається збільшення кількості аутофаголізосом. В ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР) розширюються цистерни і з'являються поодинокі ліпідоподібні включення. В мітохондріях спостерігається незначний набряк, поява окремих аморфних тіл та їх тенденція до злиття. В ядрі спостерігається периферична конденсація хроматину, розширення перинуклеарного простору, накопичення ліпідних включень. Реоксигенація на даній стадії призводить до відновлення структури і функції тканини. На *стадії незворотніх змін*, яка настає приблизно через годину, відбувається подальший гідроліз фосфоліпідів мембран і зниження рН до 5,0-5,5. Це призводить до подальшого збільшення проникності внутрішньої мембрани мітохондрій до іонів і появи проникності плазмалеми до білків. Лізосомальні ферменти виходять до цитозолу. Морфологічно, ця стадія характеризується чисельним локальним лізисом плазмалеми, розширенням цистерн вакуолярної системи, маргінацією хроматину, накопиченням ліпідоподібних включень в органелах і цитозолі. Реоксигенація на даній стадії призводить до подальшого наростання деструктивних змін. Закінчується ця стадія загибеллю клітини. Таким чином, на компенсаторній стадії у Мх спостерігається зменшення включень, на стадії зворотніх змін – поява незначного набряку, пошкодження внутрішньої мембрани мітохондрій і слабе інгібування дихального ланцюгу, а на стадії незворотніх змін – граничне роз'єднання і інгібування окисного фосфорилування внаслідок енергозалежного набряку мітохондрій, активації ПОЛ.

Отже, в цілому, на ультраструктурному рівні, гіпоксія проявляється підвищенням проникності цитолеми, різким зниженням кількості гранул глікогену, рибосом, набуханням мітохондрій, фрагментацією їх крист і вимиванням органел; набряком цитоплазми, розривом міофібрил у м'язевих клітинах, збільшенням кількості лізосом, а також жирових та інших

внутрішньоклітинних включень. Відбувається вивільнення хроматину в ядрі і ряд інших змін, ступінь яких залежить від тяжкості і тривалості гіпоксії [8].

Співробітниками нашого відділу описані морфологічні зміни, які відбуваються у Мх за різних типів гіпоксії у легенях та міокарді [31, 32]. Деякі результати цих досліджень наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

### Морфологія мітохондрій за різних типів гіпоксичного впливу

Тип гіпоксії	Легені	Міокард
<i>Гемічна гіпоксія</i> (забір крові з хвостової вени 25-30% від об'єму циркулюючої крові)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Збільшення кількості Мх;</li> <li>• Збільшення середньої площі Мх у з частково вакуолізацією;</li> <li>• Поява різноманітних форм Мх: набряклих з пошкодженими кристами (вакуолізованими, частково фрагментованими. «розчиненими»), юних Мх, мегаМх, утворенням розгалужених Мх</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Збільшення загальної кількості СС та ІМФ Мх;</li> <li>• Набухання незначної ч-ни Мх;</li> <li>• Відсутність «юних» Мх;</li> <li>• Деструкція більшості Мх (вакуолізація, порушення регулярності крист)</li> </ul>
<i>Тканинна гіпоксія</i> (імобілізаційний стрес 6 год.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Вакуолізація і деструкція (50%) Мх;</li> <li>• Утворення довгих мегаМх.</li> </ul>	1/3 СС Мх і 1/2 ІМФ – структурно-змінені: Мх з ущільненим матриксом в конденсованому стані (по периферії органел) – «парціальний некроз»; у багатьох Мх в матриксі обширні електронно-щільні прозорі зони;

При адаптації Мх до гіпоксії важлива роль належить ферментам ДЛ. Роботи Л.Д.Лук'янової вказують на те, що білки [116-119], пов'язані з формуванням адаптивної відповіді як при поодинокому гіпоксичному стимулі, так і при переривчастій і хронічній гіпоксії. Були виділені три стадії цього процесу:

1 стадія - активація МФК I (мітохондріальний ферментний комплекс I), який забезпечує посилення синтезу АТФ. Така активація відображається на первинних компенсаторних механізмах мобілізації основних клітинних ресурсів.

2 стадія – пригнічення активності МФК I (відповідно, окислення НАД-залежних субстратів) та активація МФК II – сукцинат-оксидазного шляху, циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Це дозволяє зберігати енергопродуктивність Мх на необхідному рівні на ранніх стадіях гіпоксії. Вважають, що активація сукцинат-оксидазного шляху окиснення є необхідною умовою адаптації до гіпоксії, в тому числі і до її різних режимів [105].

3-тя стадія відрізняється від двох попередніх. Це стадія декомпенсації, яка розвивається при гострій чи хронічній гіпоксії і характеризується загальною деенергізацією внаслідок порушення роботи ЕТЛ. Отже, Мх відіграють провідну роль як у підтримці гомеостазису клітини, так і в адаптації до гіпоксії.

Згідно із сучасними уявленнями, існує генетично детермінований зв'язок між функціонуванням ДЛ і транскрипційною експресією генів, які індуються при гіпоксії (HIF-1α) [107, 140, 141, 136]. Так, Лук'янова із співавторами показали [117], що активація HIF-1α після гіпоксичного впливу корелювала із активністю сукцинатоксидазного окислення. Також, у цій роботі було показано, що за умов низької активності МФК I і високої активності МФК II, посилюється індукція HIF-1α. В свою чергу, було

виявлено, що HIF 1 $\alpha$  може впливати на роботу ДЛ через активацію піруватдегідрогенази кінази I, тим самим, пригнічуючи окислення пірувату, що може бути одною з причин інактивації МФК I.

Структурні і функціональні зміни, які спостерігаються при гіпоксії, самі по собі не є специфічними, однак, їх сукупність і послідовність є специфічними для багатьох видів патології клітини [1,8]. Саме тому питання корекції гіпоксичних станів є важливою ланкою у лікуванні різноманітних хвороб.

Одним із способів адаптації до гіпоксії є метод інтервального гіпоксичного нормобаричного тренування (ІГТ). Суть його заключається в тому, що людина чи тварина дихає повітрям зі заниженим вмістом кисню (9-16%), причому така газова суміш подається з інтервалами, під час яких до організму надходить звичайне повітря, яке містить 20,9% O<sub>2</sub>. [4, 26].

Технологія методу ІГТ була розроблена ще у кінці 70-років ХХ століття Р.Б.Стрелковим і А.Я.Чижовим [15, 48]. І, хоча сьогодні він широко застосовується як нефармакологічний спосіб профілактики і корекції ряду патологічних станів [4, 15, 19, 27, 41, 46, 50, 81], механізми його впливу на організм ще досі залишаються до кінця не вивченими. Тому, для розуміння характеру впливу режиму ІГТ на організм, важливо враховувати не лише тривалість періодів гіпоксії і нормоксії, а і вивчити механізми, за якими розвиваються конструктивні зміни, а також межу, з якої починається перевага деструктивних змін.

Обговорюючи питання інтервальної гіпоксії, варто зазначити, що в багатьох роботах є своєрідне «розходження» у розумінні наслідків застосування ІГТ. Поряд із роботами, в яких розглядаються негативні наслідки хронічної інтервальної гіпоксії, в літературі представлені роботи із позитивним досвідом впливу ІГТ як на лікування низки захворювань [12, 97, 100, 101, 102] , так і на підвищення загальної резистентності організму. В той же час, варто відмітити, що не у всіх роботах чітко прописані протоколи ІГТ,

за яким мали місце такі конструктивні зміни. Це наводить на думку, що деякі положення в цих роботах носять суто теоретичний характер і не мають експериментального та клінічного підтвердження [26].

Широке поширення методів гіпоксичного тренування в клініці, спортивній та військовій практиці поставило питання про пошук найефективнішого режиму ІГТ. Такі тренування здійснюються у гіпобаричних камерах, кімнатах зі зниженим вмістом кисню, індивідуальних гіпоксикаторах [114, 121, 163, 184]. Гіпоксичні схеми, які використовуються для вивчення адаптації до ІГТ, варіюють у широких межах – від 3-12 коротких гіпоксичних сесій (2-10 хв) з 2-20- хвилинними нормоксичними інтервалами протягом 7-30 днів до гіпоксичних впливів тривалістю 1-12 год протягом 2-90 днів.

Щоб визначити, який тип режиму є більш ефективним у формуванні адаптивної відповіді, було виконано низку експериментальних робіт як зарубіжними [81, 97, 98, 99, ] так і вітчизняними колегами [2, 4, 12, 48, 50, 55, 118, 126], а також співробітниками нашого відділу [9, 26, 39, 40, 80, 90, 100, 102] було показано наступне.

Найбільш ефективним є режим із 5-ти хвилинними періодами дихання газовою сумішшю з 12%  $O_2$ , що перериваються 5-ти хвилинними інтервалами дихання атмосферним повітрям, 5-6 разів на день протягом 2-3 тижнів. Такий режим призводить до мінімального падіння м'язевого  $PO_2$  в кінці кожного гіпоксичного періоду. У Мх печінки і серця підвищувалась ефективність процесів окисного фосфорилування. При подовженні нормоксичного періоду до 15 хв, позитивні зміни також були зареєстровані, але виражені менше. Інші режими ІГТ провокували негативні реакції з боку тканинного  $PO_2$ .

Адаптація до періодичного (інтервального) гіпоксичного подразнення викликає позитивні зміни в роботі Мх, призводить до перебудови тканинного

енергозабезпечення, пов'язаного з більш економним використанням кисню[118].

Після ІГТ підвищується активність антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонредуктази. Причому, у міокарді підвищення цих показників було більш вираженим ніж у мозку та печінці [2, 90].

При ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  в легенях і міокарді зростає вміст вторинних продуктів ПОЛ, підвищується активність антиоксидантних ферментів [39, 40 153].

Позитивні зміни енергетичного забезпечення Мх печінки [26] спостерігалися впродовж 2 місяців після останнього сеансу ІГТ. Через три місяці, показники АДФ-стимульованого дихання при використанні СК та глутамату з малатом як субстратів окиснення вірогідно не відрізнялися від контролю, проте величини ДК та швидкість дихання Мх в стані  $V_3$ , у відповідь на дію СССР, ще залишалися на підвищеному рівні .

Зарубіжні вчені [126], вивчаючи вплив періодичної гіпоксії на енергетичний метаболізм Мх міокарду, показали, що періодична гіпобарична гіпоксія (6000 м, 5 год на день протягом 35 днів) покращує енергетичний метаболізм Мх міокарду після гіпоксії навантаження шляхом нормалізації рівня АТФ, активності мітохондріальної АТФ-синтази, МП та величини дихального контролю Мх.

Таким чином, у формуванні адаптивних змін при гіпоксичному тренуванні важлива роль належить Мх, і, можливо, саме вони є тим ключовим механізмом, який визначає адаптивну чи дезадаптивну дію інтервальної гіпоксії. Розкриття молекулярних, генетично детермінованих механізмів адаптації до періодичної гіпоксії є фундаментальним аспектом фізіології і патофізіології та може слугувати потенційно новим терапевтичним підходом до лікування хвороб людини, пов'язаних з дією хронічної гіпоксії різного генезу.

Із огляду літератури стає зрозумілим, що не дивлячись на багато чисельні дослідження ролі Мх в адаптації до гіпоксії, в цій проблемі залишається ще багато нез'ясованих питань. Зокрема, нема чітких даних відносно особливостей ультраструктури, просторової організації, дихальної функції та біогенезу Мх легень і міокарду при різних режимах ІГТ. Дослідженню цих питань і присвячена дана робота.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилися в Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України у відділі по вивченню гіпоксичних станів.

Для досягнення мети та вирішення поставлених задач дослідження проводили на 65-ти статевозрілих самцях щурів лінії Вістар масою 200-230г. Роботу виконували у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986), та за принципами Гельсінської Декларації (2000), а також згідно положень Комітету з біоетики Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАНУ.

Тварини були поділені на шість груп (Таблиця 2.1): перша група (n=12) - контрольні інтактні тварини; тварини другої групи (n=11) дихали гіпоксичною газовою сумішшю з 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> протягом 30 хв. Саме такий вміст O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> протягом 30 хв. Тварини п'ятої (n=10) і шостої (n=11) груп дихали гіпоксичною сумішшю з 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> 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.

Моделювання ІГТ здійснювали в герметичній камері об'ємом 10л, в яку з постійною швидкістю (в розрахунку щоб повна заміна газової суміші в камері забезпечувалася за термін не більше 1 хв.) подавалася газова суміш за допомогою модифікованого насосу «Atman». CO<sub>2</sub> поглиналося за допомогою прокаленого натронного вапна.

Таблиця 2.1

## Схема експерименту

<i><b>Групи</b></i>	<i><b>Умови експерименту</b></i>	<i><b>Експозиція</b></i>
К	контроль	Інтактні тварини
ГГ	7%O <sub>2</sub>	30 хв
ІГТ із 12% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	12% O <sub>2</sub> 5хв+нормоксія 15хв	4 цикли щоденно протягом 3 тижнів
ІГТ із 12% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub> +ГГ	(12%O <sub>2</sub> 5хв+нормоксія 15хв)+7%O <sub>2</sub>	4 цикли щоденно протягом 3 тижнів + гостра гіпоксична гіпоксія 30 хв
ІГТ із 7% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	7% O <sub>2</sub> 5хв+нормоксія 15хв	4 цикли щоденно протягом 3 тижнів
ІГТ 7% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub> +ГГ	(7%O <sub>2</sub> 5хв+нормоксія 15хв)+7%O <sub>2</sub>	4 цикли щоденно протягом 3 тижнів + гостра гіпоксична гіпоксія 30 хв

Після проведення експерименту тварин декапітували під слабким ефірним наркозом і брали зразки легень і міокарду для подальших досліджень: електронномікроскопічного, полярографічного та молекулярно-генетичного.

## **2.2. Електронномікроскопічне дослідження з морфостереометричним аналізом**

Ультраструктуру Мх у тканинах легень та міокарду досліджували електронномікроскопічним методом. Препарати для мікроскопії готували за загальноприйнятою методикою [16]. Зразки легень (з нижніх часток) та міокарду (апикальна частина) піддавали подвійній фіксації глутаральдегідом та оксидом осмію, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та заливали у суміш епоксидних смол (епон-аралдит).

Обробка матеріалу для електронномікроскопічного аналізу була проведена за схемою[52]:

1. Префіксація у глутаральдегіді – 3 год на холоді;
2. Промивка у фосфатному буфері (рН – 7,4) –2 рази по 5 хв;
3. Фіксація у розчині Колфілда –2 год на холоді;
4. Промивка у фосфатному буфері –2 рази по 5 хв;
5. Зневоднювання у спиртах:
  - 50% – 10хв
  - 60% – 10хв
  - 70% – 10хв
  - 85% – 10хв
  - 96% – 10хв
  - 96% – 20хв
  - 100% (абсолютний спирт) – 30хв
  - абсолютний ацетон – 30хв
6. Пропитка у суміші епоксидних смол (Epon-Araldit) з ацетоном (1:1) – на ніч;
7. Пропитка у суміші смол із ущільнювачем на відкритому повітрі – 24 год;
8. Заливка у капсули і полімеризація у термостаті:

- 37°C – 12 год
- 45°C – 12 год
- 56°C – 36 год.

Ультратонкі зрізи товщиною 40-60 нм контрастували ураніл ацетатом та цитратом свинцю.

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 ( $S_{itot}$ ) [6, 43].

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:

$$S_{itot} = S_{vi} \cdot V,$$

де  $S_{vi}$  – щільність мітохондрій, яка прямопропорційна числу перетинів тест-ліній із контурами поверхні мітохондрій  $N_{li}$ :  $S_{vi} = 2 \cdot N_{li}$ . Об'єм  $V$  мітохондрій визначали шляхом накладання шаблону на вимірювану структуру, доля точок, які попадали на перетини мітохондрій, рівнозначна їх об'єму [123].

Результати обробляли за допомогою програми для морфометричних розрахунків Image Tool Version 3 (США) на 130-150 полях для кожного впливу.

### **2.3. Дослідження експресії мРНК NRF-1**

Для дослідження рівнів експресії мРНК NRF-1 (одного із маркерів біогенезу Мх) спочатку виділяли із легень і міокарду тотальну РНК [68], 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.

Виділення тотальної РНК з легень і міокарду проводили з використанням набору “Trizol RNA Prep 100” (Росія), який містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат та фенол) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників).

РНК виділяли відповідно протоколу до набору для виділення, який складається з наступних етапів:

1. В пробірки загальним об'ємом 1,5 мл вносили 100 мкг подрібненої тканини, що досліджується, додавали 1 мл Trizol reagent та інтенсивно перемішували вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкубували пробірки при 4° С протягом 5 хв.

2. Додавали в пробірки 200 мкл суміші хлороформу та ізоамілового спирту у співвідношенні об'ємів 49:1 та інтенсивно перемішували вміст пробірок. Пробірки інкубували при 4°С протягом 5 хв.

3. Центрифугували (центрифуга MiniSpin „Eppendorf”, Німеччина) пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об/хв для розділення фаз.

4. Прозору верхню фазу з РНК обережно переносили в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл, намагаючись не зачепити пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

5. Додавали в пробірки рівний об'єм ізопропанолу , приблизно 600 мкл.

6. Інтенсивно перемішували вміст пробірок та переносили пробірки в морозильну камеру при  $-20^{\circ}\text{C}$  на 30хв.

7. Центрифугували пробірки з сумішшю 15 хв при 14000 об/хв.

8. Повністю видаляли супернатант перевертанням пробірки.

9. Додавали в пробірку 1 мл холодного 75% етилового спирту, обережно перемішували вміст пробірки 4-5 разів, центрифугували пробірки з сумішшю 5хв при 14000 об/хв та обережно видаляли супернатант.

10. Просушували осад 3 хв при температурі  $65^{\circ}\text{C}$ .

11. Додавали в пробірки 50-100 мкл реагенту ExiGcenc E.

12. Суспендували вміст на вортексі 15-20 с та залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв, або підігрівали при  $65^{\circ}\text{C}$  5 хв.

13. Виділену РНК зберігали при температурі  $-70^{\circ}\text{C}$  або негайно використовували для роботи.

Для зворотної транскрипції використовували „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" ("Fermentas", Литва). Транскрипційну суміш готували відповідно до протоколу:

1. Готували реакційну суміш в пробірці на льоду: тотальна РНК (500 нг - 1 мкг/мкл) - 5 мкл; random hexamer primer (0,5 мкг/мкл) - 1 мкл; деіонізована вода, очищена від нуклеаз - до 12 мкл). Обережно перемішували.

2. Інкубували суміш при  $70^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв, потім пробірки переносили на лід.

3. В пробірку, яка знаходилася на льоду, додавали наступні компоненти: 5-кратний реакційний буфер - 4 мкл, інгібітор рибонуклеаз (20 од/мкл) - 1 мкл, 10 мМ суміш dNTP - 2 мкл. Обережно перемішували.

4. Інкубували суміш при 37°C протягом 5 хв.

5. Додавали в пробірки RevertAid H Minus M –Mul V RT (200 - од/мкл) - 1 мкл. Кінцевий об'єм - 420 мкл.

6. Інкубували суміш при 42°C протягом 1 год.

7. Зупиняли реакцію прогріванням при 70°C протягом 10 хв.

8. Переносили пробірки на лід.

Методом полімеразно-ланцюгової реакції багаторазово збільшували кількість фрагменту потрібного гену. Для ампліфікації використовували по парі специфічних праймерів до кожного гену: прямий (sense) та зворотній (antisense) (синтезовані фірмою "Fermentas", Литва).

NRF-1:

sense 5'- CTGAGGAGAGCAGCGGTCGT - 3';

antisense 5'- CTTGGCCAGCGCCTCGTGGT - 3'

GADPH:

sense 5`-AACCCTAAGGCCAACCGTGAAA-3';

antisense 5`- TCATGAGGTAGTCTGTCAGGTC - 3'

Для ампліфікації брали 3 мкл кДНК (концентрація 30 - 40 нг/мкл) та додавали до суміші, що містила: 67 мМ Tris HCl (pH 8,3); 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>; 2 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,5 % Twin-20; 0,12 мг/мл БСА; 8% гліцеролу; 1,5 мМ сульфату магнію; 200 мМ суміші чотирьох нуклеотидфосфатів; по 30 пМ кожного з праймерів; 1 ОД Taq-полімерази (Аплісенс, Росія); деіонізованої води - до загального об'єму 25 мкл.

ПЛР проводили в термоциклері „Applied Biosystems 2700" ("PerkinElmer", США).

Ампліфікація фрагменту гену NRF-1 складалася з 38 циклів: денатурація - 94°C (1 хв), гібридизація праймерів - 66°C (40 с) та елонгація -

72°C (1 хв), останній цикл елонгації - 7 хв.

Ампліфікація фрагменту GADPH складалася з 32 циклів: денатурація - 94°C (1 хв), гібридизація праймерів - 61,5°C (50 с) та елонгація - 72°C (1 хв), останній цикл елонгації - 7 хв.

Ампліфікати розділяли в 1,6% агарозному гелі у TBE буфері (Тріс-боратний буфер, містить 0,089 М Тріс-борат, 0,089 М борну кислоту, 0,002 М EDTA, pH 8,0) та бромистий етидій. Візуалізацію ампліфікатів генів після горизонтального електрофорезу (160V протягом 40хв) проводили за допомогою транслюмінатору («Біоком», Росія) і програмного забезпечення ViTran.

#### **2.4. Визначення функціонального стану мітохондрій**

Дихання та окисне фосфорилування Мх вивчали полярографічним методом [63] 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 міокарду, промивали охолодженим 0,9% розчином KCl (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%, pH – 7,2. Середовище для інкубації легень містило в ммоль/л: KCl- 145, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 5, Tris HCl – 20, pH – 7,2 [149]. Середовище гомогенізації для міокарду містило (в ммоль/л): KCl - 180, HEPES – 10, EDTA – 10, BSA – 0.5%, pH – 7,2 [110]. Середовище інкубації для міокарда містило (в ммоль/л): KCl - 125, NaCl - 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 5, MgCl<sub>2</sub> – 1,5, EDTA – 3, Tris HCl – 30, pH – 7,2 [60]. 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,  $V_3$ ) та контрольованого (в метаболічному стані 4 за Чансом,  $V_4$ ) дихання Мх, дихальний контроль за Чансом ( $V_3/V_4$ ), коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О. Концентрацію білка вимірювали за методом Лоурі [144].

Кількісні результати представлені як середні  $\pm$  стандартна похибка середнього. Для визначення статистичної достовірності різниць міжгрупових середніх значень використовували  $t$  - тест Ст'юдента. Результати представляли у вигляді  $M \pm m$ , 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  $p < 0,05$ .



## РОЗДІЛ 3

### ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АДАПТИВНОГО ВПЛИВУ ДВОХ РЕЖИМІВ ІГТ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ЛЕГЕНЬ І СЕРЦЯ

В дослідженнях останнього часу, присвячених проблемі гіпоксії, значна увага приділяється питанням адаптації організму до гіпоксичних впливів і, з огляду на це, конструктивній дії гіпоксичного фактора на організм [1, 8, 22, 24, 54, 122]. При цьому, саме інтервальні гіпоксичні тренування (ІГТ) застосовують в якості тренуючого чинника [4, 15, 19, 27, 41, 46, 50, 81]. ІГТ – це один із сучасних методів адаптації до гіпоксії, технологія якого була розроблена ще у кінці 70-років ХХ століття Р.Б.Стрелковим і А.Я.Чижовим [15, 48], базується на властивості ІГТ мобілізувати адаптивні резерви організму. Різні режими ІГТ широко застосовують і сьогодні як нефармакологічний засіб профілактики і корекції патологічних станів [26]. Але межа між адаптивною та дезадаптивною дією ІГТ ще досі залишається до кінця не розкритою.

Відомо, що тривалість, частота і „жорсткість” гіпоксичних епізодів при застосуванні ІГТ є важливими складовими у досягненні адекватного протективного ефекту [133]. В той же час, як коротко-, так і довготривала, інтервальна гіпоксія (наприклад, при синдромі сонного апное) може призводити до серйозних патологічних наслідків, таких як системна гіпертензія, інсульт та когнітивні порушення [143]. Експериментальні дані доводять, що процентний вміст кисню у гіпоксичній суміші газів, тривалість епізодів гіпоксія/нормоксія під час ІГТ є критичними факторами, що детермінують адаптивний чи дезадаптивний ефект ІГТ [4, 182].

Значна роль в цих процесах повинна належати, по-перше, змінам, що відбуваються при гіпоксії та адаптації до неї у системі мікроциркуляції

завдяки збільшенню капіляризації тканин [41, 161]. Поряд з цим відбуваються зміни в ультраструктурі капілярної стінки, зокрема, відповіді ендотеліальних клітин на гіпоксичний вплив. З іншого боку, гіпоксичний вплив, змінюючи енергетичний обмін в організмі, відбивається на морфофункціональному стані мітохондріального апарату клітин різних органів [100]. Наведені факти характеризують гіпоксичний вплив на організм, проте, цей вплив недостатньо (або зовсім) не досліджений при ІГТ.

Попередні дослідження співробітників відділу [9, 26, 39, 40, 90] показали наявність вираженої органоспецифічної реакції на ІГТ як різних тканин організму, так і їх Мх. В цих роботах також було показано, що тип гіпоксії, ступінь зниження  $PO_2$ , тривалість та режим гіпоксичного впливу, найбільш ймовірно, визначають характер реакції організму на ІГТ – підвищення резистентності чи розвиток патологічних зрушень. Так, ІГТ із більш жорстким, але не тривалим гіпоксичним компонентом призводить до розбалансування прооксидантно-антиоксидантного статусу у міокарді та легенях, яке супроводжується вираженими морфофункціональними змінами. Помірна гіпоксична складова різної тривалості сприяє збереженню оптимального антиоксидантного гомеостазу і розвитку компенсаторних адаптивних змін у структурі тканини [4].

По сьогодні не встановлено механізму, який перемикає з адаптивної на дезадаптивну відповідь на гіпоксичний стимул [161]. Відкриття сімейства HIF дало змогу по-новому поглянути на молекулярні основи адаптивних і дезадаптивних відповідей на клітинному та системному рівні при дії ІГТ [143]. Prabhakar та Semenza, описали транскрипційну регуляцію експресії генів, що опосередкована факторами, індукованими гіпоксією 1 і 2 (HIF-1 і HIF-2). Автори висловлюють думку, що HIF-сигналізація не є лінійним процесом, а являє собою складну мережу з, можливо, сотні вхідних стимулів і тисячі потенційних відповідних вихідних, кожен з яких репрезентує різні гени-мішені.

Портніченко та співавт. [141] досліджуючи зміни споживання кисню, температури тіла та експресії генів HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$  в легенях у щурів молодого та зрілого віку, при адаптації до періодичної гіпоксії у барокамері, виділили чотири фази фізіологічних змін при дії ІГТ. Перша фаза, гіпометаболічна (1–3 сеанси), характеризується зниженням споживання кисню та температури тіла, індукцією HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ . У другій, перехідній фазі (3–4 сеанси) відбувається перебудовується метаболізм і знижується гіпоксична реактивність. Третя фаза, гіперметаболічна (4–5 сеанси), характеризується посиленням енергетичного метаболізму і компенсацією гіпоксичних порушень. Четверта фаза (після 5-го сеансу) – це стан метаболічної адаптації з нормалізацією споживання кисню та температури тіла, експресії HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ , мітохондріального дихання, підвищенням окиснення НАД-залежних вуглеводних і ліпідних субстратів.

При застосуванні ІГТ як в експерименті, так і в клінічній практиці, відмічалися різноманітні зміни прооксидантно-антиоксидантного стану Мх різних тканин. В експерименті після ІГТ було показано значне підвищення активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутаза, каталази, глутатіонредуктази в міокарді, в той час як їх підвищення в мозку та печінці було менш вираженим [18, 161].

ІГТ, застосовані у хворих на ішемічну хворобу серця, а також при лікуванні бронхіальної астми у дітей, викликали зниження концентрації продуктів, що реагують на тіобарбітурову кислоту, підвищення активності супероксиддисмутази, каталази та глутатіонредуктази відносно вихідних значень [161]. Введення в режим тренування гіпероксичної компоненти дало змогу досягти більш швидкого позитивного результату [39, 40].

Використання ІГТ для зменшення факторів ризику розвитку діабету представляє собою важливий аспект цієї області досліджень. Українські вчені Ю.М. Колесник з колегами [12] вперше в експерименті показали, що адаптація до інтервальної гіпоксії позитивно впливає на вуглеводний обмін у

щурів, що відображалось у підвищенні рівня інсуліну в крові, інгібуванні деструкції островків, збільшенні кількості бета-клітин в ацинозній тканині, зниженні продукції глюкагону та соматостатину. Більш пізні дослідження цих авторів довели, що двотижневий курс ІГТ викликає збільшення площі панкреатичних островків у щурів за рахунок зниження апоптозу бета-ендокриноцитів. Пілотні дослідження впливу помірних режимів ІГТ дозволили встановити, що кисень залежні транскрипційні фактори активно включаються у процес адаптації до інтервальної гіпоксії як у здорових людей, так і у людей з метаболічною дисфункцією [133, 163].

Таким чином, на сьогодні доведена можливість підвищення фізичної і інтелектуальної, а також емоційної витривалості за допомогою ІГТ. Накопичений значний досвід по профілактиці і лікуванні низки захворювань і патологічних станів вказує на те, що при встановленні оптимального режиму ІГТ важливо дотримуватися одного загального принципу: жорсткість і тривалість гіпоксичного впливу мають обмежуватися тією фізіологічною нормою, при якій ще можливі ефективні компенсаторні і функціональні перебудови. Відомо, що формування адаптивного ефекту Г залежить від тривалості, «жорсткості» та періодичності гіпоксичного впливу, стану організму і має органоспецифічні ознаки [30, 31]. Однак, механізми такого формування вивчені не достатньо, оскільки в процесі ІГТ виникає і ряд деструктивних змін, які часто нівелюють отримані конструктивні ефекти.

Якщо роль Мх в розвитку гіпоксії вивчена більш-менш достатньо, то даних, які описують морфологічні та функціональні зміни, що відбуваються у Мх під час застосування різних 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.

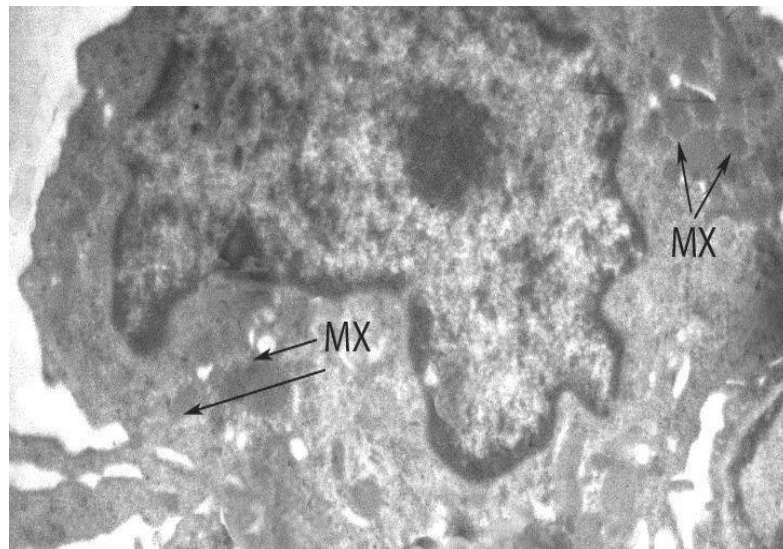
Завдання даної роботи були також направлені на дослідження органоспецифічних реакцій мітохондріального апарату на різні режими ІГТ, виявлення адаптивних морфофункціональних змін мітохондріального апарату легень і міокарду. Їх інтерпретація дозволить розширити уявлення про механізми дії ІГТ на Мх та наблизитися до розуміння межі між адаптивним та дезадаптивним впливом нормобаричних гіпоксичних тренувань.

### **3.1. Морфо- та стереометричні характеристики мітохондрій в тканинах легень та серця**

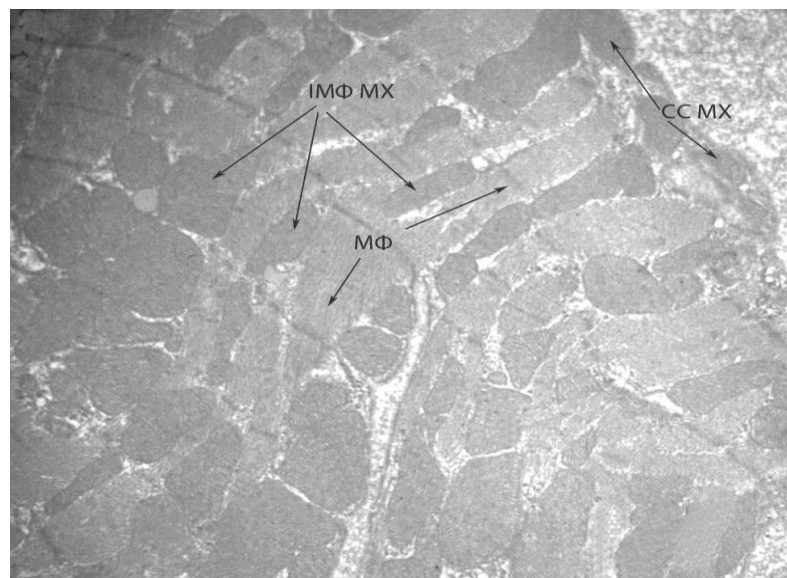
Мх приймають участь у регуляції ряду фізіологічних функцій, забезпечуючи енергією більшість внутрішньоклітинних процесів, необхідних для життєдіяльності організму. До них відносяться, перш за все: скоротлива функція міокарду, скелетних та гладеньких м'язів, підтримка іонних градієнтів у збудливих тканинах, акумуляція декретованого матеріалу у везикулах і підтримка гормональної і нейротрансмітерної функції тощо [23]. Саме тому, залежно від тканинної приналежності, Мх різняться за кількістю, морфологічною особливістю у різних тканинах. Така специфічність, в першу чергу, залежить від енергетичних потреб та функціональних особливостей тканини. Оскільки наше дослідження стосувалося Мх легень і міокарду, розглянемо органоспецифічні особливості організації їх мітохондріального апарату.

Респіраторний відділ легень є життєво важливою ділянкою дихальної системи де здійснюється газообмін. Клітинна вистилка альвеолярної стінки представлена, головним чином, трьома типами клітин: малі альвеолярні клітини, великі альвеолярні клітини (пневмоцити), альвеолярні макрофаги [5, 10, 11, 44]. Мх клітин поверхневого легеневого епітелію невеликі за розміром

і зустрічаються у невеликій кількості. Розміщуються вони або навколо ядер, або в потовщених ділянках цитоплазматичних відростків. Мх клітин альвеолярного епітелію чисельні, великих розмірів (0,4-0,5 мк). Мають овальну чи паличковидну форму, хоча інколи зустрічаються досить крупні, витягнуті в довжину Мх (Рис.3.1.а).



**а**



**б**

**Рисунок 3.1 - Ультраструктура Мх легень (а) і міокарду (б) інтактних тварин.** Умовні позначення: Мх - мітохондрії, ІМФ Мх-інтраміофібрилярні Мх, МФ - міофібрили СС Мх - субсарколемальні Мх.

Виділяють дві популяції Мх міокарду: субсарколемальну та міжміофібрилярну. Ті мітохондрії, які перебувають у безпосередньому контакті із сарколемою, є субсарколемальними (СС), а мітохондрії, які розташовуються поміж міофібрил й не мають явного контакту із сарколемою – інтраміофібрилярні (ІМФ) [13, 14, 93]. Інтраміофібрилярні мітохондрії мають як правило витягнуту форму, утворюють поздовжні ряди між міофібрилами, їх розміри коливаються від 0,5 до 1 мкм у ширину та від 1 до 2 мкм у довжину. Субсарколемальні мітохондрії різноманітні за розмірами і формою, мають паличкоподібну, сферичну або підковоподібну форму і, як правило, орієнтовані перпендикулярно міофібрилам. Їх кристи мають пластинчасту структуру, тоді як інтраміофібрилярні – трубчасту або змішану трубчасто-пластинчасту форму. Мітохондрії різних топологічних зон кардіоміоциту щурів [53]: навколядерної, міжміофібрилярної, субсарколемальної та тієї, що контактує з обмінною судиною (паравазальна локалізація). На думку авторів, це пов'язано з морфологічною та функціональною гетерогенністю органел. Аналогічний розподіл мітохондрій за локалізацією в клітині, ґрунтуючись на особливостях функціонального профілю, виділяє G.A.Porter [142]. Отже, Мх міокарду і легень мають свої органоспецифічні особливості, знання яких дозволяє дослідникам більш чітко інтерпретувати їх морфофункціональні зміни в експериментальних умовах та шукати нові шляхи корекції ряду патологічних станів цих тканин та організму в цілому. У нашій роботі ми описували зміни ультраструктури Мх міокарду, описуючи СС та ІМФ Мх.

При дослідженні ультраструктури і просторової локалізації Мх у легнях та міокарді при впливі обраних режимів ІГТ були отримані наступні результати. Застосування ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> призвело до зростання загальної кількості Мх легень у 2, 5 рази (таблиця 3.1), а у міокарді – в 2 рази в обох субпопуляціях Мх: субсарколемальній (СС Мх) та інтраміофібрилярній (ІМФ Мх) (таблиця 3.2), порівняно із контрольними показниками.

Таблиця 3.1

**Морфометричні та стереометричні характеристики мітохондрій  
легень після застосування ІГТ ( $M \pm m$ ,  $n=150$ )**

Умови експерименту	Загальна кількість Мх, од./мкм <sup>2</sup>	Кількість структурно змінених Мх, %	Середній діаметр Мх, мкм	Сума поверхонь Мх в одиниці об'єму тканини $S_{i\text{tot}}$ , мкм <sup>2</sup>
Контроль	9,6±0,2	4,6±0,5	0,39±0,01	5,7±0,5
ІГТ із 12% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	23,6±1,1**	15,0±0,9*	0,44±0,02*	8,2±0,4*
ІГТ із 7% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	19,0±0,7*	27,3±1,2**	0,68±0,05**	9,1±0,4*

Примітки: \* - відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,05$ ); \*\* - відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,01$ );  $n$  - кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

Таблиця 3.2

**Морфометричні та стереометричні характеристики мітохондрій  
міокарду після застосування ІГТ ( $M \pm m$ ,  $n=150$ )**

Умови експерименту	Загальна кількість Мх, од./мкм <sup>2</sup>		Кількість структурно змінених Мх, %		Середній діаметр Мх, мкм		Сума поверхонь Мх в одиниці об'єму тканини, $S_{i\text{tot}}$ мкм <sup>2</sup>	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
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
ІГТ із 12% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	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*
ІГТ із 7% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	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*

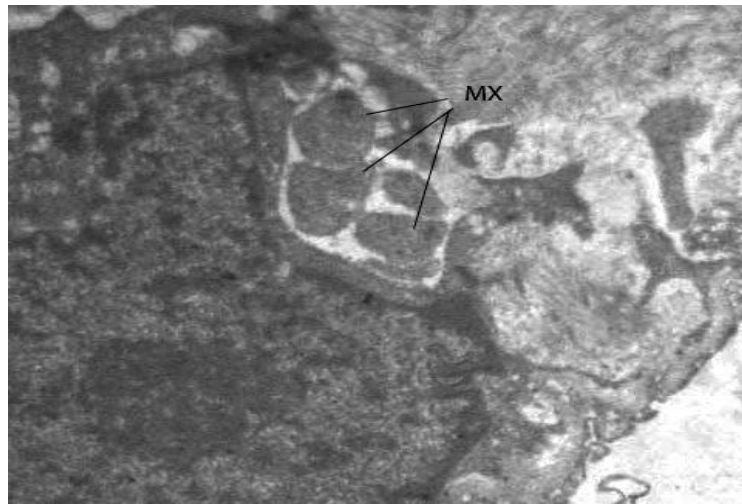
Примітки: \* - відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,05$ ); \*\* - відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,01$ );  $n$  - кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.



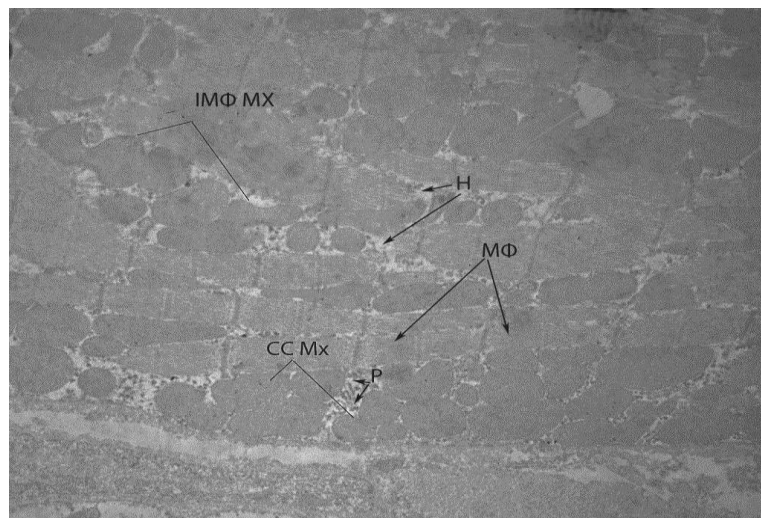
Однакове за ступенем зростання маси Мх обох субпопуляцій при такому режимі ІГТ може вказувати на розвиток компенсаторних змін за рахунок інтенсифікації біогенезу Мх, направлених на забезпечення міокарду достатньою кількістю АТФ.

В обох тканинах зростає 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 (і більш виражене у легенях) 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, [37,38, 170, 183], що носить адаптивний характер.

Відомо, що Мх, які локалізовані у різних частинах клітини, можуть мати різну морфологію, знаходитися у різних функціональних станах, по-різному взаємодіяти із іншими внутрішньоклітинними органелами та мати різну чутливість до оксидативного стресу і гіпоксії [108]. Всередині клітини Мх утворюють взаємопов'язану, збалансовану цілісну систему та постійно проходять етапи злиття та поділу [109]. Динамічна рівновага мітохондріальної популяції є однією із ліній захисту клітини від пошкоджуючих впливів [176, 181], оскільки функціонування пошкоджених Мх може бути відновлено в процесі злиття із сусідніми інтактними Мх. Якщо в контролі Мх респіраторного відділу легень розміщуються або навколо ядер або в потовщених ділянках цитоплазматичних відростків [52], то після застосування ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  вони зосереджувалися нерівномірно в альвеолоцитах обох типів і, як правило, гуртувалися разом (Рис.3.2. а).



а



б

**Рисунок - 3.2. Ультраструктура Мх легень (а) і міокарду (б) після ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>, динамічні зміни Мх апарату. ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх; СС Мх - субсарколемальні Мх, Н – набряк, Р – рибосоми, МФ - міофібрили. Зб. 9600 (а), 6200 (б)**

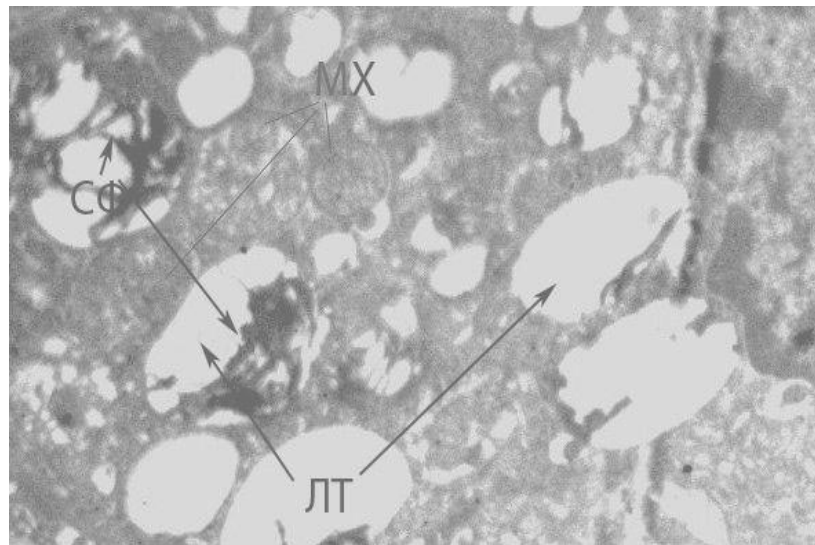
У міокарді Мх (частіше у ІМФ фракції) мали ознаки процесів дроблення-злиття, що свідчить про активні динамічні зміни у мітохондріальному апараті під час ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. Процеси злиття Мх переважали у місцях пошкодження міофібрил, що вказує на можливість міжмітохондріального обміну для оптимізації роботи пошкоджених гіпоксією Мх.

Було б важливим з'ясувати за допомогою методу конфокальної міроскопії, які саме динамічні зміни відбуваються під час ІГТ у Мх міокарду - мітохондріальне злиття чи дроблення - оскільки направленість динамічних процесів у Мх та їх баланс відображає функціональний стан клітини [57]. Злиття та дроблення Мх регулюється під час апоптозу [180]. Після апоптичної стимуляції баланс між злиттям та поділом обривається і Мх фрагментуються [59]. Більш того, аномальна мітохондріальна динаміка відображає дисфункцію Мх (пов'язану із регуляцією енергетичного метаболізму,  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізацією, продукцією АФК, збереженням мтДНК тощо) та зумовлює розвиток ряду патологічних процесів як у міокарді, так і у інших тканинах [65].

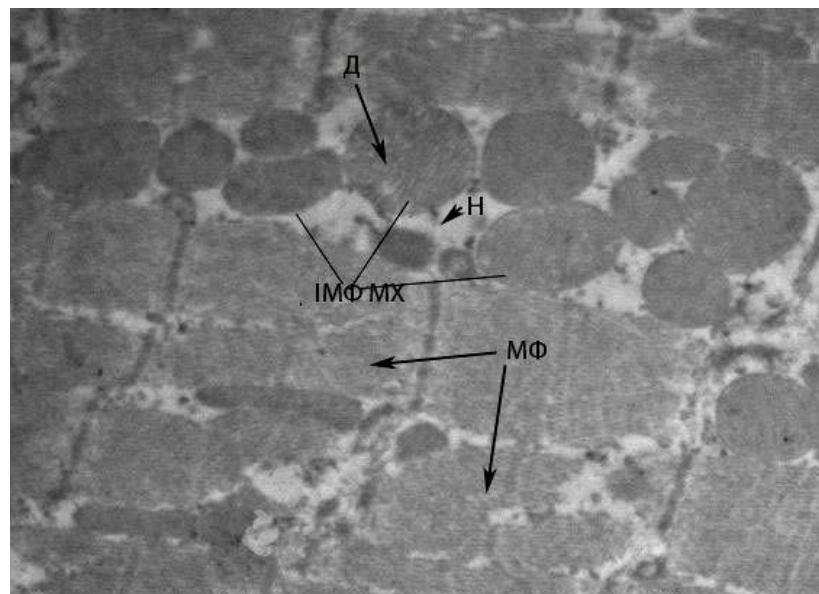
На тлі застосування ІГТ із 12%  $\text{O}_2$  в  $\text{N}_2$  зростав відсоток структурно-змінених органел в обох досліджуваних тканинах. Так, у легенях він збільшився у 3,3 рази (див. Табл. 1), у міокарді – в 5,2 рази (СС Мх- 4,7 рази; ІМФ Мх 5,6 рази). Гетерогенність мітохондріальної популяції зросла як за рахунок конструктивних змін у морфології Мх (зміна форми крист, поява юних Мх, зростання кількості крист), так і за внаслідок деструктивних змін (просвітлення і розрідження матриксу, поява вакуолізованих органел, із різним ступенем лізису крист) (Рис.3.3.).

В літературі, зростання гетерогенності Мх [56, 108] пов'язують із змінами метаболічного стану клітини, зокрема із порушенням кальцієвої сигналізації та зростанням рівня АФК [132]. Серед Мх легень поряд із неушкодженими і юними Мх зустрічалися органели із просвітленим матриксом, частково чи повністю вакулізованою внутрішньої мембраною. Як і у легенях, у кардіоміоцитах зустрічалися Мх із різним ступенем пошкодження та лізису крист. Особливо виражено такі органели зустрічалися і місцях пошкодження міофібрил. Такі зміни свідчать про наявність вираженого гіпоксичного навантаження при ІГТ із 12%  $\text{O}_2$  в  $\text{N}_2$ . Поодинокі, у міокарді спостерігали появу поодиноких мієлінізованих Мх, що вказує на

зниження процесів окисного фосфорилування, зменшення утворення АТФ у цих ділянках кардіоміоциту [29, 75] та на розвиток дисфункції Мх.



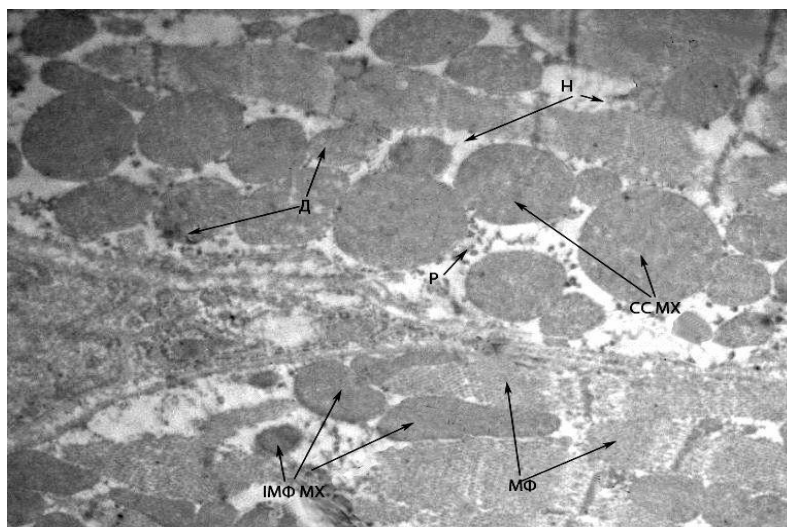
**а**



**б**

**Рисунок - 3.3. Гетерогенність мітохондріальної популяції легень (а) і міокарду (б) після ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. Умовні позначення: МФ - міофібрила, ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх, Н – набряк, Д - деструкція. Зб. 12000.**

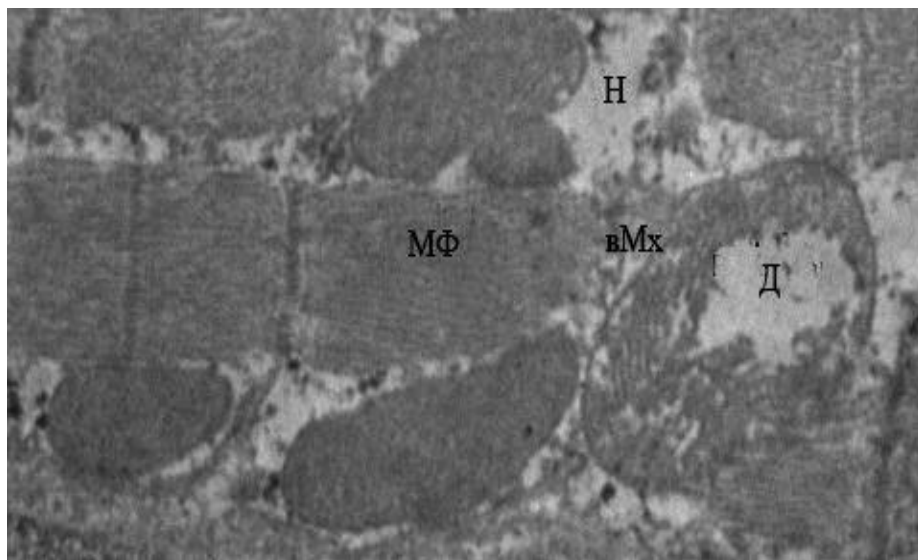
ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  призвело до зростання величини середнього діаметру Мх легень - у 1,2 рази (таблиця 3.1.) і міокарду – вдвічі у СС Мх (таблиця 3.2), та в 1,6 рази у ІМФ фракції Мх, порівняно із контролем. У легенях збільшення цього показника пов'язано з вакуолізацією Мх, тоді як у міокарді зростання діаметру Мх зумовлене, переважно, зміною форми Мх із повздожньої (досить вираженої серед ІМФ фракції) на округлу (див. Рис.3.3., Рис.3.4).



**Рисунок 3.4. - Ультраструктура Мх міокарду після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ .** Умовні позначення: МФ - міофібрила, ІМФ Мх - інтраміофібрилярна Мх, Н – набряк, Р – рибосоми, Д - деструкція. Зб. 12000.

Ми розглядаємо ці зміни як адаптивний процес збереження адекватного рівня енергетичного метаболізму. Поява вакуолізованих органел (див. Рис.4а) вказує на зміну проникності мембран Мх, що зумовлена зростанням продукції АФК внаслідок розвитку гіпоксичного стану [ 39, 40, 51, 132]. У міокарді вакуолізовані Мх зустрічалися, як правило, в місцях з більшим міжфібрилярним набряком (Рис.3.5) і носили ознаки мітоптозу, що починається з внутрішньої мембрани [115]. У легенях вакуолізовані Мх, як правило, зосереджувалися у місцях із спустошеними ламелярними тільцями

та ендотеліальним набряком аеро-гематичного бар'єру.



**Рисунок 3.5. - ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> призводить до переваги серед ІМФ Мх органел із ознаками деструкції, що зосереджувалися у місцях пошкодження міофібрил кардіоміоциту. Умовні позначення: МФ - міофібрила, вМх - вакуолізована Мх, Н – набряк, Д - деструкція. Зб 20000.**

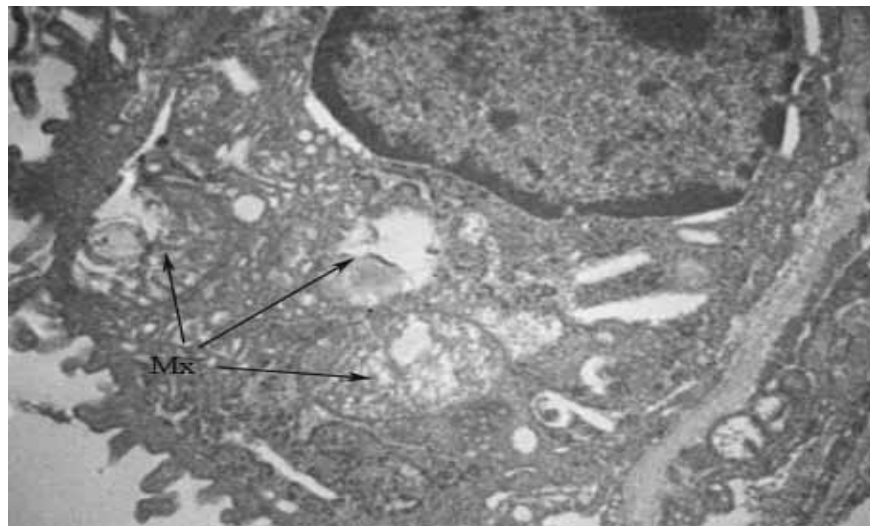
Суттєвою характеристикою стану мітохондріального апарату клітин є сумарна поверхня досліджуваних органел, на одиницю об'єму тканини [6]. Важливість цього параметру пов'язана з тим, що він відображає сумарну довжину контурів досліджуваних структур в одиниці об'єму, в нашому випадку – мембран Мх, розміщених у об'ємі тканини міокарду. Оскільки основна функція Мх – енергетична, а ферменти, що забезпечують її є мембранозв'язаними, то довжина мембран Мх, як вказувалося, може слугувати показником здатності цих органел здійснювати свою головну функцію у метаболізмі клітини.

Сума поверхонь Мх в одиниці об'єму тканини ( $Si_{tot}$ ) легень після ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> достовірно зросла – в 1,4 рази (таблиця 3.1), а у міокарді - в СС фракції Мх - у 2,2, а в ІМФ фракції Мх - у 2 рази (таблиця 3.2.) по

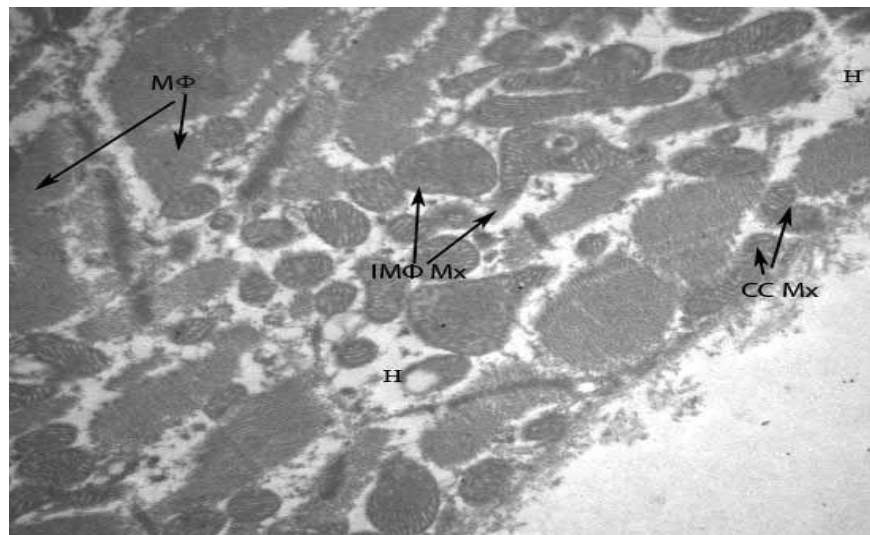
відношенню до контрольних величин. Більш виражене зростання цього показника в міокарді, порівняно з легенями, вказує на вищу енергетичну потужність Мх за рахунок збільшення довжини внутрішньої мембрани Мх - місця функціонування ферментів електрон-транспортного ланцюга.

Морфостереометричне дослідження впливу ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  показало, що загальна кількість Мх у легенях і міокарді щурів зросла (таблиця 3.1, таблиця 3.2), порівняно із контрольними показниками (легені - в 2 рази; міокард СС Мх - в 1,7 рази, ІМФ Мх - в 1,4 рази) однак дещо менше, ніж під впливом ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ , що також вказує на меншу ініціюючу морфогенез Мх дію цього режиму ІГТ. В легенях, відсоток структурно-змінених органел, по відношенню до контрольного показника, зріс в 6 разів (див. Табл.1), а у міокарді - в 10,6 рази (СС Мх- в 10 разів ІМФ Мх - в 11,2 рази (див. Табл. 2). Результати електронномікроскопічного дослідження впливу ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  показали більш виражене зростання гетерогенності мітохондріальної популяції, порівняно із ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ , в обох досліджуваних тканинах (Рис. 3.6.а, б).

Після застосування ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною компонентою зростання гетерогенності мітохондріальної популяції обумовлювалося активацією роботи мітохондріального конвеєру, направленої на репарацію пошкоджених Мх, вираженими деструктивними змінами та збільшенням загальної кількості структурно-змінених Мх. Юні Мх зустрічалися в значно меншій кількості, аніж після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ . Як і після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ , у місцях лізису міофібрил (який був більш вираженим, порівняно із станом міокарду після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ ) та біля ядра спостерігали гуртування Мх (Рис.3.7).



а

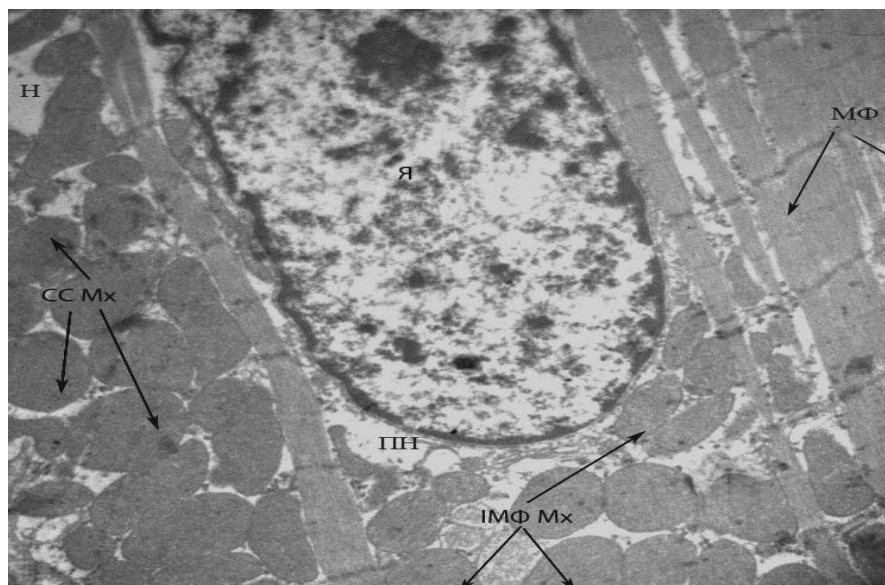


б

**Рисунок 3.6. - Ультраструктура Мх легень (а) і міокарду (б) після ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$ . Умовні позначення: МФ - міофібрили, ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх, СС Мх - субсарколемальні Мх, Н - набряк. Зб. 12000 (а), 9600 (б).**

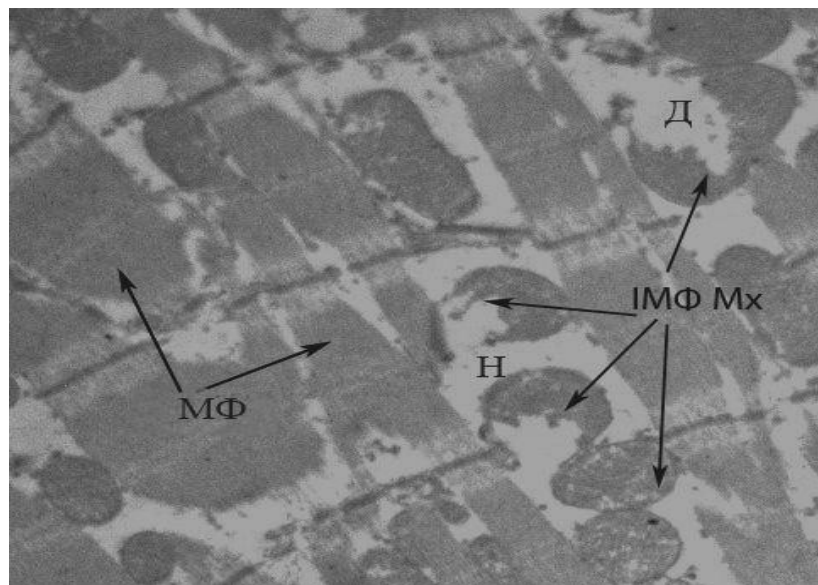
Гуртування Мх біля ядра вказує на напруження функціонального стану клітини та активацію біосинтезу білків, необхідних для відновлення пошкоджених органел. В кардіоміоцитах поодинокі зустрічалися мієлінізовані органели (що свідчить про розвиток дисфункції Мх), тоді як в легенях таких патологічних змін Мх не спостерігалось.





**Рисунок 3.7 - ІМФ Мх біля ядра кардіоміоциту.** Умовні позначення: ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх, СС Мх - субсарколемальні Мх, МФ – міофібрили, Н – набряк, ПН – перинуклеарний набряк. Зб. 9600

На тлі застосування ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою зросла і величина середнього діаметру Мх у легенях (таблиця 3.1) – в 1, 8 рази, а в міокарді (таблиця 3.2) - в ІМФ Мх- в 1,8 рази, а у СС Мх - в 2, 5 рази, головним чином, за рахунок зміни проникності мембран Мх і вакуолізації останніх. Так, у легенях ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> призвело до появи більшої кількості Мх з частковою чи повною вакуолізацією, деструкцією внутрішньої і навіть зовнішньої мембрани, просвітленням матриксу (див. Рис. 3.6.а). В Мх міокарду також спостерігали просвітлення матриксу та руйнування крист, однак поряд із такими деструктивними змінами в Мх (Рис.3.8), особливо серед ІМФ фракції, зустрічали функціонально активні Мх, із ущільненим матриксом та неушкодженими мембранами (див. Рис.3.6.б) ( що може свідчити про перевагу гліколітичного шляху утворення АТФ).

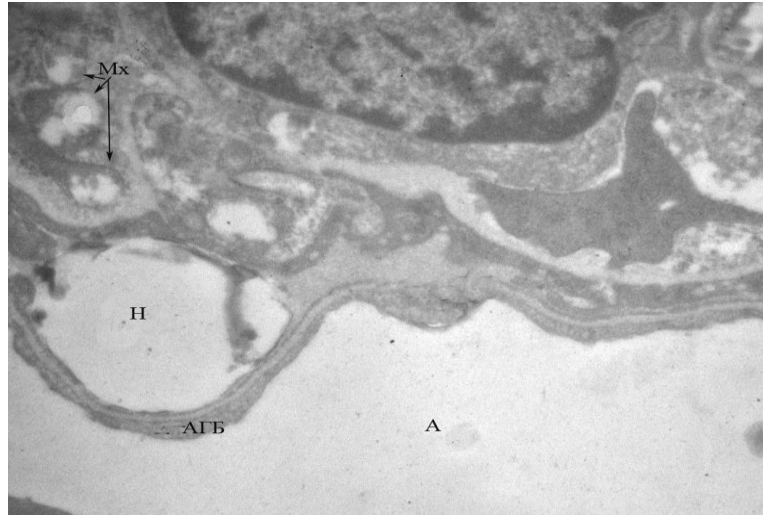


**Рисунок 3.8 - Ультраструктура Мх міокарду після ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>.**  
Умовні позначення: МФ - міофібрили, ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх, Н – набряк, Д – деструкція. Зб. 9600

Однак, не дивлячись на чисельні морфологічні зміни Мх, що вказують на їх деенергізацію під час застосування ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>, в обох досліджуваних тканинах показник  $Si_{tot}$  зростав (див.табл. 3.1, 3.2), що свідчить про виражений конструктивний ефект цього навіть, здавалось би, жорсткого режиму, обумовлений активацією їх морфогенезу: у легенях  $Si_{tot}$  зріс в 1,6 рази по відношенню до контрольного показника, а у міокарді - в 1,7 рази у СС Мх і в 1,5 рази у ІМФ Мх. Це може свідчити про зростання енергетичної потужності Мх за рахунок збільшення довжини внутрішньої мембрани та відіграє певну конструктивну роль на фоні описаних деструктивних змін у мітохондріальній популяції, тим самим, певною мірою, оптимізуючи енергетичний метаболізм клітини.

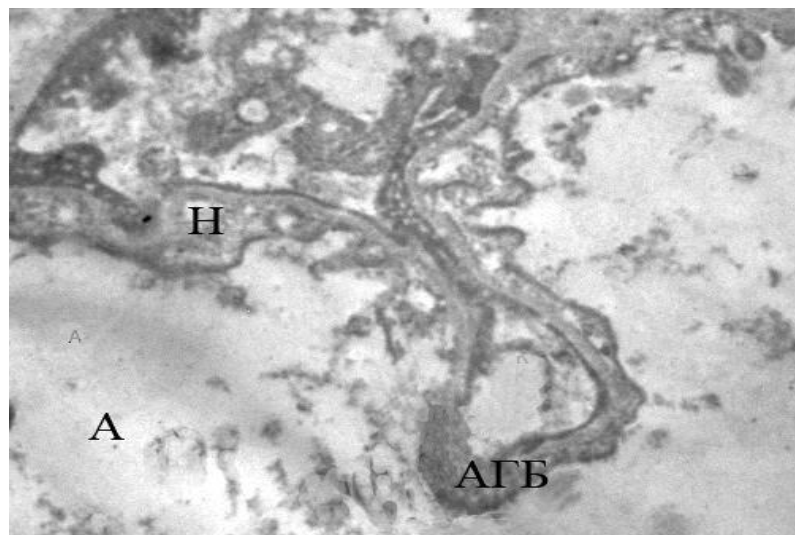
Цікаво відмітити, що описані нами зміни мітохондріального апарату легень і міокарду, що розвиваються на тлі застосування обраних режимів ІГТ, кореспондують зі змінами морфологічних показників, що характеризують транспорт кисню та біосинтетичні процеси на рівні цілісної тканини. Так, у легенях щурів ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> призвело до зростання

товщини аеро-гематичного бар'єру (АГБ), головним чином, за рахунок потовщення ендотелію капілярів (Рис. 3.9), тоді як товщина епітелію залишалася практично не зміненою.



**Рисунок 3.9 - Ультраструктура тканини легень після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ .** Умовні позначення:, Мх- мітохондрії, А – альвеола, АГБ – аерогематичний бар'єр, Н - набряк. Зб. 6200.

Потовщення ендотеліального шару відбувалося за рахунок інтенсивного піноцитозу, що свідчить про інтенсифікацію процесів метаболізму і вказує на адаптивний характер змін. В той же час, було виявлено спустошення у частини альвеолоцитів II типу ламелярних тілець (див.Рис 3.3.а), що вказує на зниження синтезу сурфактанту під час такого режиму ІГТ. Іншим важливим доказом зміни синтезу сурфактанту є різна товщина сурфактантної вистилки на поверхні альвеол. Синтез сурфактанту у легенях щурів після ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  (як і після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ ) також знижується, про що свідчить більш виражене запусівання ламелярних тілець (див.Рис 3.6.а) та зменшення вільного сурфактанту на поверхні альвеол. Подекуди, в альвеолах зустрічався локальний підендотеліальний набряк з утворенням «пухирів» з електроннопрозорим вмістом та спостерігалася виражена деструкція окремих шарів АГБ (Рис 3.10).



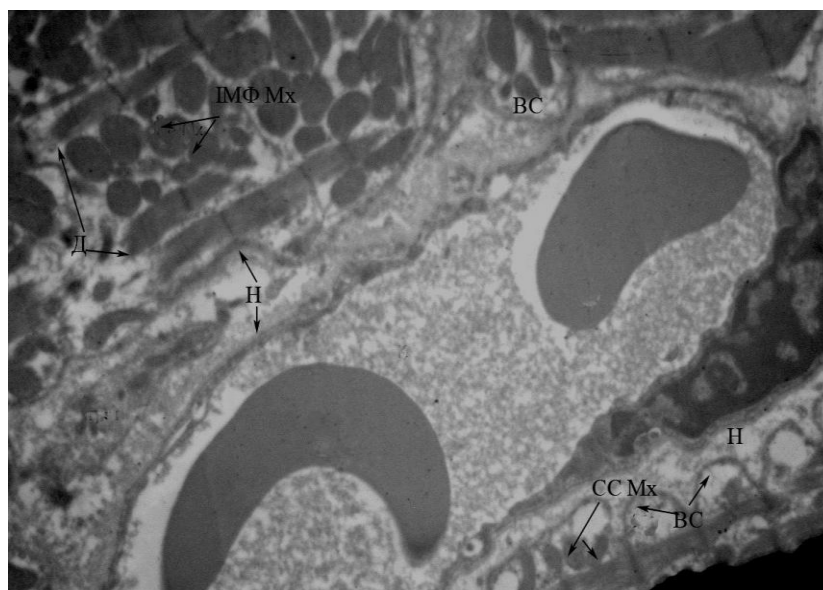
**Рисунок 3.10 - Ультраструктура тканини легень після ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$ .** Умовні позначення: Н - набряк, А – альвеола, АГБ – аерогематичний бар'єр. Зб. 6900.

У міокарді обидва режими ІГТ викликали міжміофібрилярний набряк, збільшення товщини гісто-гематичного бар'єру, місцями з ознаками крайового набряку сарколеми та кардіоміоцитів (Рис. 3.11).

У деяких кардіоміоцитах навіть спостерігали появу перинуклеарного набряку, що вказує на збільшення проникності плазматичних мембран кардіоміоцитів внаслідок гіпоксичного впливу. Варто відмітити, що ступінь таких змін був більш вираженим саме після застосування ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою.

Більш характерним для ІГТ із 7 %  $O_2$  в  $N_2$  було формування з боку сарколеми ворсинкоподібних утворень, що містили в собі СС Мх. Цей процес можна розглядати як адаптивний, що направлений на зменшення шляху дифузії кисню при таких гіпоксичних умовах. Однак, такі «ворсинки сарколеми» в одних кардіоміоцитах були «розтягнуті» ендотеліальним набряком гістогематичного бар'єру і містили СС фракцію Мх, що мала 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.



**Рисунок 3.11 - Ультраструктура тканини міокарду після ІГТ із 7 %  $O_2$  в  $N_2$ .** Умовні позначення: К - капіляр, ПКП - перикапілярний простір, Імф Мх- інтраміофібрилярні Мх, ВС - ворсинки сарколеми, Н – набряк, Д - деструкція. Зб. 6900.

Отже, отримані в ході морфологічного та стереометричного досліджень дані вказують на те, що обрані режими ІГТ ініціюють ряд адаптивних змін, що проявляються у зміні структури і функціонування Мх і носять виражений органоспецифічний характер. Адаптивний вплив ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  полягав у інтенсифікації біогенезу Мх, активації динамічних процесів, направлених на зниження пошкодження Мх (лізису крист, просвітлення матриксу та вакуолізації), перебудові крист у більш енергетично ємну форму і збільшенні їх кількості і, як наслідок, збільшення показника  $Si_{tot}$ . Були також відмічені

помірні деструктивні процеси в Мх, що вказує на наявність пошкоджуючого впливу цього режиму ІГТ в обох тканинах (розрідження та пошкодження крист, поява вакуолізованих Мх, розрідження та частковий лізис міофібрил, поодинокі мієлінізація органел у міокарді).

Адаптивні зміни в Мх легень і міокарду після застосування ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  також проявлялися в активізації їх морфогенезу (збільшення числа органел і зростання показника  $Si_{tot.}$ ), динаміки (гуртування Мх між собою та біля ядра), утворенні ворсинкоподібних випинчувань сарколеми кардіоміоциту, однак супроводжувалися більш вираженими деструктивними процесами як у Мх, так і в тканині легень і міокарда в цілому. Цей режим поглибив ступінь деструктивних змін у Мх, що проявлявся в збільшенні серед мітохондріальної популяції (на відміну від ІГТ із помірною гіпоксичною складовою) відсотка пошкоджених органел та появи Мх з ознаками повної втрати їх функціональності (Мх із розривом зовнішньої мембрани та майже відсутніми розрідженими кристами, мієлінізовані Мх міокарду). У міокарді адаптивні перебудови у СС і ІМФ фракціях Мх також мали свої особливості. Так, СС фракція мігрувала: розміщувалася у «ворсинках сарколеми» і мала або цілісну структуру із збереженими кристами і затемненим матриксом, або набувала ознаки деструктивних змін - розріджений просвітлений матрикс та потоншені кристи. ІМФ фракція Мх, внаслідок масивного пошкодження та лізису міофібрил, концентрувалася разом та біля ядерної зони.

### 3.2. Рівні експресії мРНК NRF-1 в тканинах легень та серця

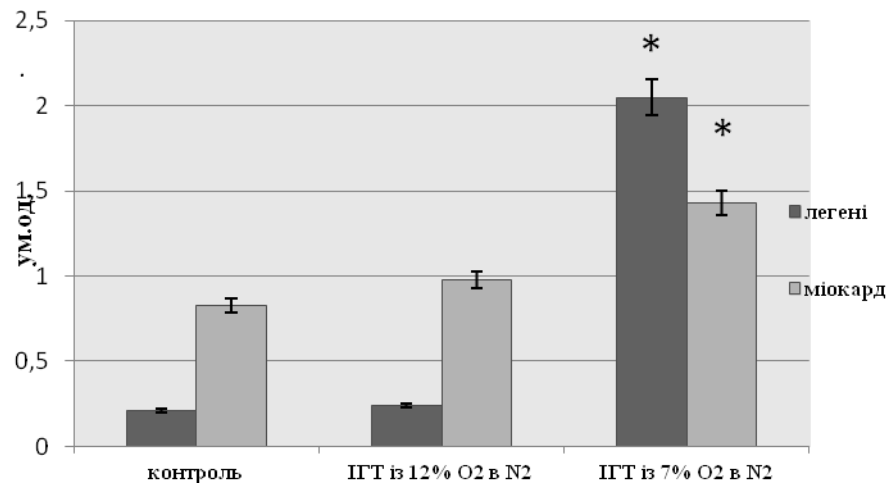
NRF-1 вперше був описаний як активатор гену цитохрому c [78]. Сьогодні вже відомо [73, 92], що цей фактор транскрипції активує експресію кількох ключових генів, що регулюють ріст та розвиток клітини, ядерних генів, що регулюють процеси мітохондріального дихання, біосинтез гемоглобіну та транскрипцію і реплікацію мтДНК.

Наші дослідження за допомогою ПЛР та зворотної транскрипції довели, що рівень експресії мРНК NRF-1 у міокарді контрольних тварин був вищим в середньому в 4 рази, порівняно з легеньми (Рис. ). Ми пояснюємо цей факт тим, що кількість Мх у легнях і міокарді відрізняється, а також має ряд органоспецифічних особливостей. Така специфічність, в першу чергу, залежить від енергетичних потреб та функціональних особливостей тканини. Так, у легнях кількість цих органел в нормі становить в середньому 9 Мх на клітину (див. табл.3.1), тоді як в міокарді – в середньому 20 Мх (див. Табл.3.2). Більш того, Мх міокарду мають субпопуляції Мх, які порізноmu реагують на гіпоксичний стимул.

Застосування ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> не викликало достовірних змін рівнів експресії мРНК NRF-1 в обох досліджуваних тканинах (Рис 3.12), хоча ці зміни мали тенденцію до зростання (легені –на 14%, міокард – 18%).

Невисоке підвищення рівнів експресії мРНК NRF-1 після ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> супроводжувалося зростанням загальної кількості органел, появі юних Мх та зростанням показника Si<sub>tot</sub>, тобто вираженою інтенсифікацією процесів біогенезу. Така динаміка змін вказує на те, що під час ІГТ із помірною гіпоксичною складовою цей фактор грає далеко не домінуючу роль у біогенезі Мх. Відомо, що NRF-1 – є одним із маркерів біогенезу Мх [72, 82], поряд із PGC-1alpha та beta [111, 156, 157] (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, beta), NRF-2 та Tfam (mitochondrial transcription

factor A). PGC-1alpha, PGC-1beta та NRF-1, 2 регулюють транскрипцію мітохондріальних генів, що знаходяться в ядерній ДНК, тоді як Tfam регулює транскрипцію мтДНК [82]. Тому, для того, щоб з'ясувати який саме фактор є ключовим в активації біогенезу при ІГТ було б доцільним у майбутньому дослідити рівні експресії мРНК інших маркерів біогенезу.



**Рисунок 3.12 - Експресія мРНК NRF-1 у легенях і міокарді після застосування двох режимів ІГТ.** \* - відмінності достовірні відносно контролю до ІГТ ( $p < 0,05$ )

В той же час, застосування ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> значно збільшувало рівні експресії мРНК NRF-1 в обох досліджуваних тканинах (у легенях – в 10 разів, у міокарді – 1,7 рази), порівняно із контрольними показниками (див.Рис.3.), однак загальна кількість Мх, поява юних органел та зростання Si<sub>tot</sub>, було не так виражене, як після ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> (див. табл.3.1., 3.2).

Чим можна пояснити такі виражені зміни експресії цього гену? Як відомо, NRF-1 активує промотори різних ядерних генів, які кодують синтез компонентів ДЛ Мх, опосередковано регулює експресію білкових компонентів трьох субодиниць цитохром с оксидази, а також активує промотори факторів транскрипції та реплікації мтДНК [136]. Тобто зростання експресії мРНК NRF-1 у легенях після ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> може



свідчити про підвищення потреб у відновленні білків ДЛ. Ймовірно, зростання рівнів експресії мРНК NRF-1 необхідне для відбудови пошкоджених гіпоксією мембран Мх, що ми спостерігали за результатами морфо- та стереометричних досліджень. А виражена органоспецифічність експресії цього гену, скоріш за все, пояснюється морфо-функціональними особливостями Мх легень і міокарду та різним функціональним навантаженням досліджуваних тканин.

Таким чином, отримані в ході молекулярно –генетичного дослідження дані вказують на те, що зміни рівнів експресії мРНК NRF-1 є органоспецифічними і залежать від ступеня жорсткості гіпоксичної компоненти ІГТ – чим жорсткіший гіпоксичний стимул, тим вищі рівні експресії мРНК цього гену.

### **3.3. Зміни дихання і фосфорилування у мітохондріях в тканинах легень та серця**

Як відомо, Мх - це тонкий індикатор і регулятор змін кисневого гомеостазису організму [105]. Встановлено, що у тварин за умов фізіологічної норми спостерігаються високі значення спряженості дихання і окисного фосфорилування та ефективності використання кисню [17, 119]. Цей процес регулюється внутрішньоклітинним балансом між відновленими та окисленими формами піридинових нуклеотидів, співвідношенням АДФ/АТФ, концентрацією субстратів окиснення, чисельними факторами, які здатні модифікувати стан мітохондріальної мембрани.

В ході наших досліджень, ми також мали змогу переконатися, що швидкість споживання кисню та ефективність процесів окисного фосфорилування залежала від субстрату окиснення. В якості таких субстратів ми використовували сукцинат натрію (СК) та глутамат натрію і

малат натрію сумісно.

Сукцинат (СК) є ФАД-залежним субстратом окиснення і проміжним продуктом метаболізму. Як енергетичний субстрат він окислюється за участю фермента класу оксидоредуктаз - сукцинатдегідрогеназою (СДГ), віддаючи електрони й протони у ДЛ. У результаті такого окиснення з однієї молекули сукцинату синтезуються дві молекули АТФ. Використання глутамату та малату дає змогу оцінити функціонування всіх ділянок спряження окисного фосфорилування, в тому числі і НАД-залежні процеси в умовах експерименту. Відомо, що сукцинат окислюється в екстремальних умовах, за яких використання НАД-залежних субстратів суттєво зменшується [33, 34].

Аналіз впливу ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  на функціональний стан Мх легень показав, що при окисленні СК швидкість АДФ-стимульованого дихання в стані  $V_3$  достовірно знижувалася (на 12%) (Табл.3.3), порівняно із контролем, що може свідчити про зниження інтенсивності окислювальних процесів. При цьому ступінь спряженості процесів дихання та окисного фосфорилування ( $V_3/V_4$ ) достовірно зріс на 12%, а показник ефективності використання кисню (АДФ/О) та швидкість контрольованого дихання - вірогідно не змінювалися. При окисненні глутамату з малатом в Мх легень після дії ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  швидкість поглинання кисню в стані  $V_3$  достовірно знижувалася (на 17%), порівняно із контролем. За цих умов достовірно зростали як величини ДК (на 14%), так і АДФ/О (11%) на фоні відсутності вірогідних змін величини контрольованого дихання по відношенню до контрольних показників.

Таким чином, ІГТ із помірною гіпоксичною складовою у Мх легень щурів призводить до компенсаторного зниження швидкості споживання кисню на фоні зростання величин спряженості процесів окиснення із фосфорилуванням та ефективності фосфорилування за цих умов. Це свідчить про те, що ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  викликає перебудову енергетичного

обміну у Мх легень шляхом посилення і ФАД-, і НАД-залежного окиснення (хоча з перевагою НАД-залежного окиснення), яка направлена на економізацію роботи дихального ланцюга Мх легень. Деструктивні процеси у Мх за такого режиму також мали місце і виражалися у достовірному зростанні кількості структурно-змінених органел до 18%. Серед них зустрічалися Мх з різним ступенем вакуолізації та з частково чи повністю зруйнованою внутрішньою мембраною, що може свідчити про ініціацію мітоптозу [130]. Все ж деструктивні морфофункціональні зміни при такому режимі ІГТ не домінували над конструктивними і супроводжувалися помірним зростанням рівня експресії мРНК NRF-1 у легенях щурів.

Дослідження стану енергетичного метаболізму при окисненні СК після ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> виявило достовірне зниження споживання кисню Мх легень в стані V<sub>3</sub> (на 21,6%); величини контрольованого дихання, ДК та АДФ/О при цьому не мали достовірних змін, порівняно з контролем. Не мали достовірних змін і зазначені показники дихання Мх при окисненні НАД-залежних субстратів. Отримані дані свідчать про те, що ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> не покращує регуляцію кисень залежних процесів та не збільшує резистентності до гіпоксії дихального ланцюга у Мх легень щурів. Такі енергетичні процеси у Мх легень супроводжувалися перевагою деструктивних змін мітохондріального апарату та 10-ти кратним зростанням рівнів експресії мРНК NRF-1 у досліджуваній тканині. Можна вважати, що серед конструктивних (компенсаторних) проявів дії ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> було зростання загальної площі мембран Мх та активація процесів біогенезу Мх, що, ймовірно, і дозволило підтримувати енергетичний метаболізм на рівні контрольних значень.

Таблиця 3.3

Зміни показників дихання і фосфорилування мітохондрій легень після двох режимів ІГТ

(M $\pm$ m)

Умови експерименту	V <sub>3</sub> , нг атом O . хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>4</sub> , нг атом O . хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	АДФ/О мкм АДФ/Н2 ат. О	V <sub>3</sub> , нг атом O . хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>4</sub> , нг атом O . хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	АДФ/О мкм АДФ/Н2 ат. О
Субстрат окиснення – 10 ммоль/л сукцинату натрію								
Субстрати окиснення - 5ммоль глутамату натрію +2,5ммоль малагу натрію								
контроль	40,0 $\pm$ 2,41	19,1 $\pm$ 2,72	2,12 $\pm$ 0,13	1,61 $\pm$ 0,17	32,1 $\pm$ 2,51	12,9 $\pm$ 2,37	2,48 $\pm$ 0,19	2,45 $\pm$ 0,14
ІГТ із 12% O <sub>2</sub> в N2	35,2 $\pm$ 2,11*	14,8 $\pm$ 2,91	2,38 $\pm$ 0,13 *	1,76 $\pm$ 0,11	33,5 $\pm$ 2,43*	11,9 $\pm$ 2,08	2,82 $\pm$ 0,12*	2,71 $\pm$ 0,10*
контроль	34,3 $\pm$ 3,12	15,3 $\pm$ 2,87	2,25 $\pm$ 0,09	1,48 $\pm$ 0,11	25,0 $\pm$ 3,14	10,1 $\pm$ 2,88	2,48 $\pm$ 0,12	2,28 $\pm$ 0,13
ІГТ із 7% O <sub>2</sub> в N2	26,9 $\pm$ 4,07*	12,6 $\pm$ 3,03	2,14 $\pm$ 0,12	1,54 $\pm$ 0,12	22,5 $\pm$ 4,15	8,9 $\pm$ 3,16	2,54 $\pm$ 0,17	2,35 $\pm$ 0,14

Примітки: \* - p&lt;0,05 відносно контролю

Обробка хроноамперометричних кривих показала, що у міокарді щурів після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  показники дихання  $Mx$  суттєво відрізнялися від контрольних значень (Табл. 3.4.). Так, при окисненні СК вірогідно знижувалося споживання кисню у третьому метаболічному стані (на 12,6%), тоді як швидкість контрольованого дихання, величини ДК та АДФ/О не демонстрували достовірних змін. При окисненні НАД-залежних субстратів реєстрували вірогідне зростання (на 21%) величини ДК та АДФ/О (на 20%) по відношенню до контрольних величин, тоді як швидкість фосфорильовального та контрольованого дихання залишалися на рівні контрольних значень. Отримані дані вказують на те, що ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  ініціює перебудову метаболічних потоків енергозабезпечення міокарду шляхом посилення НАД-залежного окиснення, яке супроводжується підвищенням енергетичного стану  $Mx$  міокарду за рахунок зростання спряження процесів окиснення із фосфорильованням та ефективності фосфорильовання  $Mx$  кардіоміоцитів. На морфологічному рівні такі енергетичні перебудови супроводжувалися інтенсифікацією біогенезу  $Mx$ , перебудовою крист у більш енергетично ємну форму - трубчасту, дугоподібну, пластинчасту- і збільшення їх кількості (і, як наслідок, зростання  $Si_{tot}$  ).

Застосування ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою при окисненні СК  $Mx$  міокарда призвело до вірогідного зниження (на 20%) швидкості фосфорильовального дихання порівняно з контрольним значенням. Інші показники енергетичного забезпечення при ФАД- і НАД-залежному окисненні залишалися на рівні контрольних значень.

Таблиця 3.4

Зміни показників дихання і фосфорилування мітохондрій міокарда після двох режимів ІГТ

(M±m)

Умови експерименту	V <sub>3</sub> , нг атом О . хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>4</sub> , нг атом О . хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	АДФ/О мкм АДФ/Н2 ат. О	V <sub>3</sub> , нг атом О . хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>4</sub> , нг атом О . хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	АДФ/О мкм АДФ/Н2 ат. О
Субстрат окиснення – 10 ммоль/л сукцинату натрію				Субстрати окиснення - 5ммоль глутамату натрію +2,5ммоль малату натрію				
контроль	60,2±3,45	21,9±2,93	2,75±0,14	1,50±0,11	54,3±3,76	22,0±2,57	2,47±0,11	2,32±0,11
ІГТ із 12% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	52,6±2,88*	17,8±2,51	2,96±0,12	1,67±0,10	60,7±4,10	20,4±2,92	2,98±0,12*	2,78±0,11*
контроль	41,81±3,44	17,0±2,74	2,45±0,18	1,57±0,12	40,8±3,87	13,0±2,44	3,13±0,14	2,46±0,12
ІГТ із 7% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	33,6±3,88*	14,4±2,92	2,33±0,17	1,62±0,12	35,0±2,28	10,8±2,88	3,24±0,11	2,53±0,10

Примітки: \*- p&lt;0,05 відносно контролю

Таким чином, даний режим ІГТ не ініціював підвищення адаптивних можливостей у Мх міокарда досліджуваних тварин, направлених на збільшення ефективності споживання кисню. При цьому рівні експресії одного із досліджуваних маркерів біогенезу, який відповідає за синтез білків дихального ланцюга Мх - мРНК NRF-1 зростав в 1,7 рази порівняно з контрольними значеннями, що супроводжувалося більш вираженими деструктивними процесами в мітохондріальному апараті міокарду; це проявлялося у збільшенні серед мітохондріальної популяції (на відміну від ІГТ із помірною гіпоксичною складовою) відсотка пошкоджених органел та появі Мх з ознаками повної втрати їх функціональності.

## РОЗДІЛ 4

### ТЕСТУЮЧЕ ГІПОКСИЧНЕ НАВАНТАЖЕННЯ ЯК ФАКТОР ВИЯВЛЕННЯ ЯКОСТІ АДАПТИВНИХ ЗМІН МІТОХОНДРІАЛЬНОГО АПАРАТУ, СФОРМОВАНИХ ПІД ЧАС ГІПОКСИЧНИХ ТРЕНУВАНЬ

Вважають, що під час ІГТ в організмі відбувається формування адаптивних змін, які, в подальшому, дозволяють підвищувати стійкість організму до стресу, надмірних навантажень та гіпоксії [4, 19, 25, 30, 55, 118, 121, 126]. Однак, ефективність такого адаптивного впливу, головним чином, визначається особливостями ІГТ - тривалістю, частотою і жорсткістю гіпоксичного навантаження. Хоча багато робіт присвячено дослідженню механізмів дії ІГТ на організм, особливості його коригуючого впливу на клітинному, ультраструктурному рівні залишаються до кінця не розкритими. У роботах К.В.Розової показано, що дія ІГТ носить органоспецифічний характер [9], однак, які саме ультраструктурні зміни визначають цю органоспецифічність та при яких режимах ІГТ коригуючий вплив є найбільш вираженим?

У роботі ми використовували два режими ІГТ - із 12%  $O_2$  в  $N_2$  та із 7%  $O_2$  в  $N_2$ , що тривали протягом трьох тижнів. Для того, щоб виявити «якість» адаптивних змін мітохондріального апарату легень і міокарду, що розвивалися під час досліджуваних ІГТ, ми застосовували гостре гіпоксичне навантаження (ІГТ 7%  $O_2$  в  $N_2$  протягом 30 хв) на попередньо тренуваних за допомогою ІГТ тварин.

Попередніми роботами наших співробітників [39] було показано, що експериментальну нормобаричну гостру гіпоксію (ІГТ) (дихання 30 хв повітрям, що містить 7%  $O_2$ ) можна використовувати як маркер «адаптивних резервів» організму і досліджуваної тканини. Вибір газової суміші саме такого складу був зумовлений тим, що зниження концентрації кисню до 7% дає можливість виявити межі адаптивних можливостей організму як на

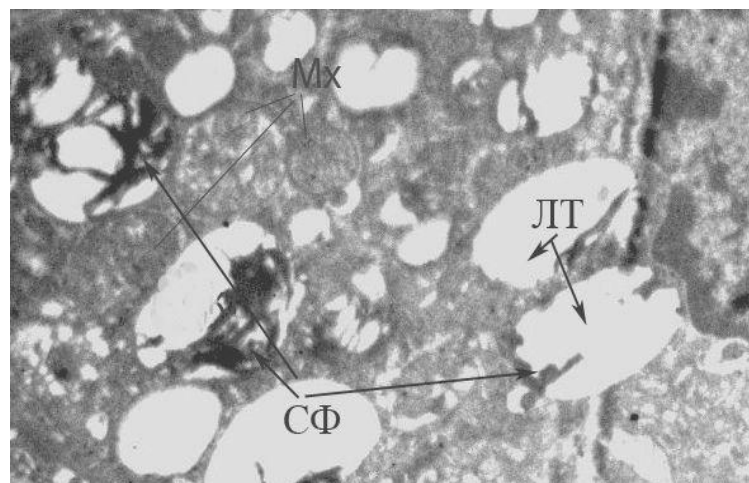


системному, так і на тканинному рівні . Саме тому, ми використовували її для перевірки ефективності двох режимів ІГТ.

#### **4.1. Морфо - та стереометричні характеристики мітохондрій в тканинах легень та серця при тестую чому гіпоксичному навантаженні**

На теперішній час прийнято розрізняти 4 основні напрямки, за якими відбувається зміна Мх при гіпоксії: 1) зміна кількості крист; 2) зміна структури крист; 3) зміна форми Мх та 4) поява мегаМх [31, 35]. Особливо важливою характеристикою є зміна форми крист, оскільки вона визначає конфігураційний енергозалежний стан, в якому знаходиться Мх, що, в свою чергу, характеризує активність синтетичних процесів мітохондрій [35, 37, 38, 170, 183].

Проведені нами дослідження дозволили виявити більш широкий спектр змін в Мх тканини легень та міокарду при ІГТ. Вплив ІГТ у легенях призвів до появи у мітохондріальній популяції органел з їх частковою вакуолізацією (Рис.4.1.).



**Рисунок 4.1 - Особливості ультраструктури Мх легень після впливу ІГТ. Умовні позначення: Мх - мітохондрії, ЛТ – ламелярні тільця, СФ- сурфактант, А-альвеола, Я - ядро. Зб. 9600.**

Варто відмітити, що така вакуолізація Мх носила мозаїчний характер – на електронограмах чергувалися ділянки тканини з практично не ушкодженими органелами, з ділянками на яких були Мх з різним ступенем вакуолізації.

Поява мозаїчності є наслідком різного функціонального напруження в момент дії ГГ чи з активізацією компенсаторних механізмів в тканині, клітині або в окремій органелі, що може свідчити про активізацію процесів утилізації пошкоджених Мх з дискомплексованими кристами шляхом аутолізу. Поява вакуолізованих Мх може бути як наслідком зміни проникності мітохондріальної мембрани, так і наслідком їх конформаційних перебудов.

Також зустрічалися Мх із пошкодженими кристами та набряклими міжкристними проміжками. У деяких Мх порушення цілісності внутрішньої мембрани проявлялося у частковій дезорганізації органели. Такий тип змін ультраструктури Мх після впливу ГГ може вказувати на ініціацію апоптичних процесів у клітині, що, на думку Скулачева, реалізується розвитком одного із різновидів мітоптозу, що починається з деструктивних процесів внутрішньої мембрани Мх [164].

Дослідження стану мітохондріального апарату легень після 30-ти хвилинного впливу ГГ за допомогою морфометричного аналізу показало, що загальна кількість Мх у тварин цієї групи достовірно збільшувалася (в 1,5 рази) порівняно із контролем (Табл. 4.1). Кількість структурно змінених Мх складала 18%, тобто перевищувала контрольний показник у 3,7 рази. Для більш чіткого розуміння процесів, які відбувалися у Мх при дії 30-ти хвилинної ГГ, величину загальної кількості Мх співвідносили до зміни показників середнього діаметру Мх та суми поверхонь Мх в одиниці об'єму ( $Si_{tot}$ ). Оскільки середній діаметр Мх достовірно збільшувався але не перевищував 30%, порівняно із контролем (див. табл. 3.1), ми можемо

говорити про перевагу адаптивних змін над дезадаптивними у Мх легень при ГГ, не дивлячись на наявну вакуолізацію Мх різного ступеня вираженості.

Таблиця 4.1.

**Морфометричні та стереометричні характеристики мітохондрій легень при гострій гіпоксії ( $M \pm m$ ,  $n=150$ )**

Умови експерименту	Загальна кількість Мх, од./мкм <sup>2</sup>	Кількість структурно змінених Мх, %	Середній діаметр Мх, мкм	Сума поверхонь Мх в одиниці об'єму тканини, $Si_{tot}$ , мкм <sup>2</sup>
Контроль	9,6±0,2	4,6±0,5	0,39±0,01	5,7±0,5
7% O <sub>2</sub> 30хв	15,1±0,6*	18,7±0,7**	0,51±0,02*	8,0±0,2*

Примітки: \* відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,05$ ); \*\* відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,01$ );  $n$  – кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

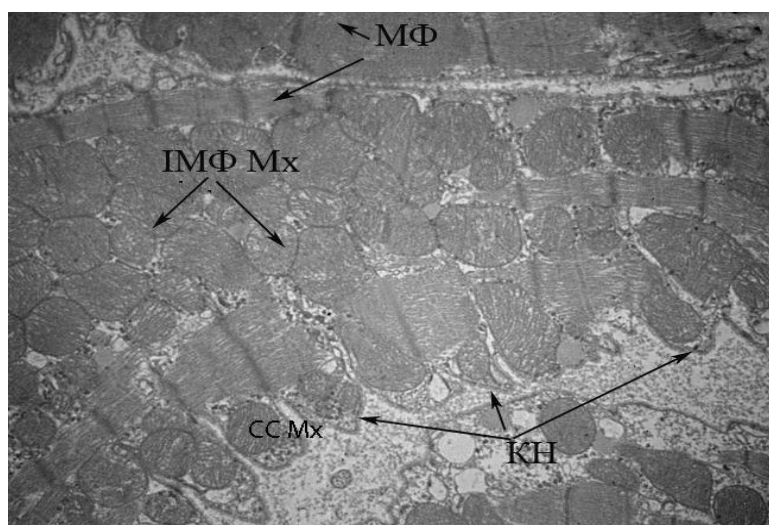
Величина  $Si_{tot}$  у тварин цієї групи збільшувалася у 1,4 рази порівняно із контролем, що пов'язано зі зростанням загальної кількості органел. Така динаміка зміни  $Si_{tot}$  може свідчити про збереження енергетичної потужності мітохондріального апарату в тканині легень, оскільки ферменти, які забезпечують функціонування дихального ланцюгу (ДЛ) Мх, є мембранозв'язаними [9]. Отримані результати електронно-мікроскопічного та морфометричного дослідження стану мітохондріального апарату тканини легень після дії ГГ дозволили виявити суттєві відмінності як ультраструктури так і морфометричних параметрів Мх порівняно із контролем. Паралельно проведене дослідження функціонального стану мітохондріального апарату та рівня експресії одного із ключових факторів, що регулюють біогенез Мх - NRF-1 дозволять наблизитися до розуміння направленості процесів, що відбуваються в Мх у відповідь на ГГ.

Як відомо, кількість мітохондрій динамічно реагує у відповідь на

енергетичні потреби клітини [176]. Існування енергетично активних мітохондрій має велике значення у синтезі достатньої кількості АТФ та, як наслідок, у реалізації нормальної скоротливої функції міокарду. Всередині клітини вони утворюють взаємопов'язану, збалансовану цілісну систему та постійно проходять етапи злиття та поділу [181]. Зміна кількості Мх може відбуватися за рахунок динамічних змін мітохондріального апарату чи внаслідок ініціації морфогенезу (біогенезу) Мх. Як показали наші дослідження, СС і ІМФ Мх по-різному реагують на гострий гіпоксичний вплив. Описуючи ультраструктурні зміни Мх міокарду після 30-ти хвилинної експозиції ГГ, важливо відмітити, що Мх були розміщені більш компактно, аніж у контролі, що вказує на перевагу процесів злиття.

Окрім гіпергідратації та ділянок деструкції гістогематичного бар'єру, деструктивні процеси мали місце і в самому міокарді. Перш за все, відбувалося просочення рідиною м'язової тканини, що супроводжувалося роз'єднанням міофібрил та місцями з частковою чи повною втратою їх структурної цілісності. Також, мало місце утворення інвагінацій і випинань сарколемального краю кардіоміоцитів із характерним утворенням ворсинкоподібних структур, майже в кожній із яких знаходилася мітохондрія, компенсуючи тим самим зростання шляху дифузії для  $O_2$ , а відтак і розвиток тканинної гіпоксії (Рис.4.2).

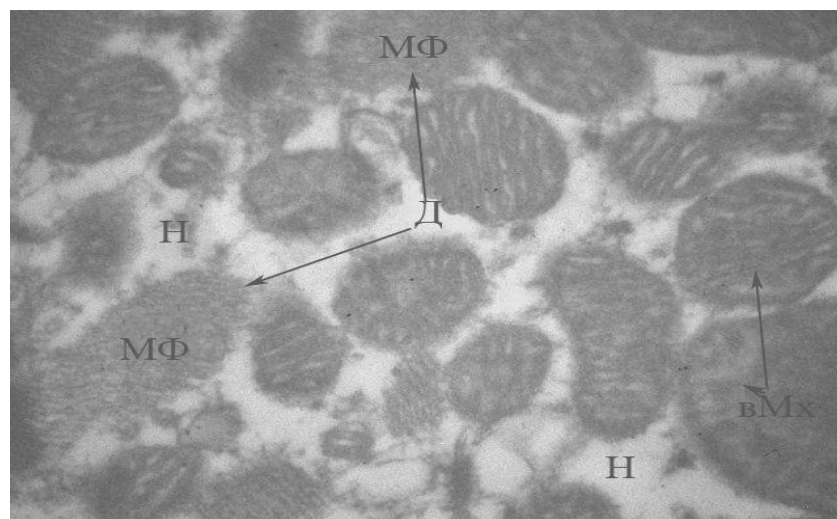
Важливою особливістю є поява Мх у різних конфігураційний станах, зокрема поява Мх з везикулярними кристами. Всі ці дані можна розглядати як свідчення високої активності енергетичних процесів (Рис. 4.3.). Прийнято розрізняти 4 конфігураційні енергозалежні стани Мх: ортодоксальне, енергізоване, деенергізовано та енергізовано-скручене [170, 183]. Останнє часто ототожнюється із Мх, що мають тубуло-везикулярні кристи і розглядається як свідчення високої активності синтетичних процесів в органелі. Таким чином, поява Мх з везикулярними кристами може вказувати на високу мітохондріальну активність у тканині при дії ГГ.



**Рисунок 4.2 - Ультраструктура Мх міокарду після ГГ.** Умовні позначення: Вс- ворсинки сарколеми, СС Мх- субсарколемальні Мх, ІМФ Мх- інтраміофібрилярні Мх, МФ – міофібрили, КН – краєвий набряк кардіоміоцита. Зб. 12000

Іншим цікавим фактом є поява у значній кількості структурно-змінених Мх оптично-щільних гранул, що ймовірно говорить про накопичення преципітатів кальцію у Мх, і розглядається як компенсаторна реакція, спрямована на зв'язування надлишку кальцію, котрий надходить в Мх при несприятливих впливах на організм і свідчить про суттєві зміни кальцієвого обміну [20, 38].

Оскільки незворотно зв'язаний  $\text{Ca}^{2+}$  не здатний впливати на мітохондріальний метаболізм, можна припустити, що виявлений процес перешкоджає ініціації мітоптичних змін у цих органелах, які можуть ініціюватися завдяки порушенню кальцієвого обміну. У міокарді спостерігалася часткова вакуолізація Мх, проте в більшості органел мало місце ущільнення матриксу, що може бути побічним свідченням пригнічення гліколізу [49].



**Рисунок 4.3 - Ультраструктура Мх міокарду після ГГ.** Умовні позначення: ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх, вМх – везикулярні Мх, МФ – міофібрила, Н – набряк, Д - деструкція. Зб. 16200.

Морфометричне дослідження стану мітохондріального апарату міокарду показало (Табл. 4.2.), що на 30-ти хвилинний гіпоксичний вплив субпопуляції Мх реагують по-різному.

Дія ГГ призводила до збільшення загальної кількості Мх міокарда у обох субпопуляціях, але кількість СС Мх зросла у 2,6 рази, а ІМФ - у 1,9 рази, порівняно із контролем. Дія ГГ призвела до збільшення діаметру Мх, однак більш виражено у органелах ІМФ субпопуляції, аніж у СС Мх. Так, середній діаметр СС Мх достовірно збільшувався в 1,5 рази, а ІМФ – в 1,8 рази.

Кількість структурно змінених СС Мх у міокарді після дії ГГ зросла на 22,7%, а ІМФ – на 18,5%. Такий характер змін у різних субпопуляціях Мх може свідчити про як різну зміну проникності мембран Мх та ступінь їх набухання, так і про різні механізми реакції двох субпопуляцій Мх на ГГ. При виявлених змінах величин загальної кількості Мх, кількості структурно змінених Мх та їх середнього діаметру відносно контролю, не менш важливим параметром, може виступати сума поверхонь Мх в одиниці об'єму

( $Si_{tot}$ ). Як ми згадували у підрозділі 3.1., значимість зміни величини  $Si_{tot}$  може свідчити про на зміну споживання  $O_2$  тканиною легень, оскільки, ферменти ДЛ є мембранозв'язаними. При гострій гіпоксії спостерігалось зростання суми поверхонь Мх: СС Мх - у 1,8 рази, а ІМФ Мх – у 1,3 рази порівняно із контролем. Збільшення суми поверхні Мх в одиниці об'єму при ГГ, поряд із збільшенням загальної кількості органел, певною мірою пояснює можливість підвищення енергетичної ємності міокарду.

Таблиця 4.2.

**Морфометричні та стереометричні характеристики мітохондрій міокарду при гострій гіпоксії ( $M \pm m$ ,  $n=150$ )**

Умови експерименту	Загальна кількість Мх, од./мкм <sup>2</sup>		Кількість структурно змінених Мх, %		Середній діаметр Мх, мкм		Сума поверхонь Мх в одиниці об'єму тканини, $Si_{tot}$ мкм <sup>2</sup>	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
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
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*

Примітки: \* - відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,05$ ); \*\* - відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,01$ ); а – кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

Підсумовуючи зміни морфометричних характеристик Мх міокарду при ГГ, важливо відмітити, що виражені зміни спостерігалися в обох субпопуляціях Мх, але більш чутливою до дії ГГ виявилася СС фракція Мх. Порівнюючи результати морфо- та стереометричного дослідження стану Мх легень і міокарду після 30-ти хвилинного впливу ГГ, варто зазначити, що конструктивні зміни суттєво домінували над деструктивними в обох тканинах і носили виражений компенсаторно-пристосувальний характер.

Додатковий гіпоксичний стимул у легенях тренуваних тварин (ІГТ 12%  $O_2$ -+ ГГ) призвів до достовірного зростання загальної кількості Мх, по відношенню до дії ГГ на нетренуваних. Зростання кількості Мх вказує на

активізацію процесів біогенезу Мх під час ІГТ з 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. По відношенню ж до ІГТ з 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> дія ГГ не призвела до достовірних змін цього показника у легенях тренуваних тварин.

Дія ГГ призвела до достовірного зниження кількості структурно-змінених Мх у легенях тренуваних ІГТ з 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>, порівняно із „чистою” ГГ, що вказує на активацію репаративних процесів у Мх легень тренуваних тварин, що були «напрацьовані» під час цього режиму ІГТ. В якості таких репаративних змін може виступати як біогенез повноцінних Мх - що необхідно не тільки для збільшення мітохондріальної маси, так і вчасна утилізація пошкоджених Мх- мітофагія [129, 171]. По відношенню ж до ІГТ з 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> кількість структурно-змінених Мх у легенях тренуваних тварин на фоні ГГ не мала достовірних змін (Табл.4.3.).

Таблиця 4.3.

**Стереометричні характеристики мітохондрій легень після застосування ІГТ з 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> та тестуючої дії ГГ (M±m, a=150)**

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

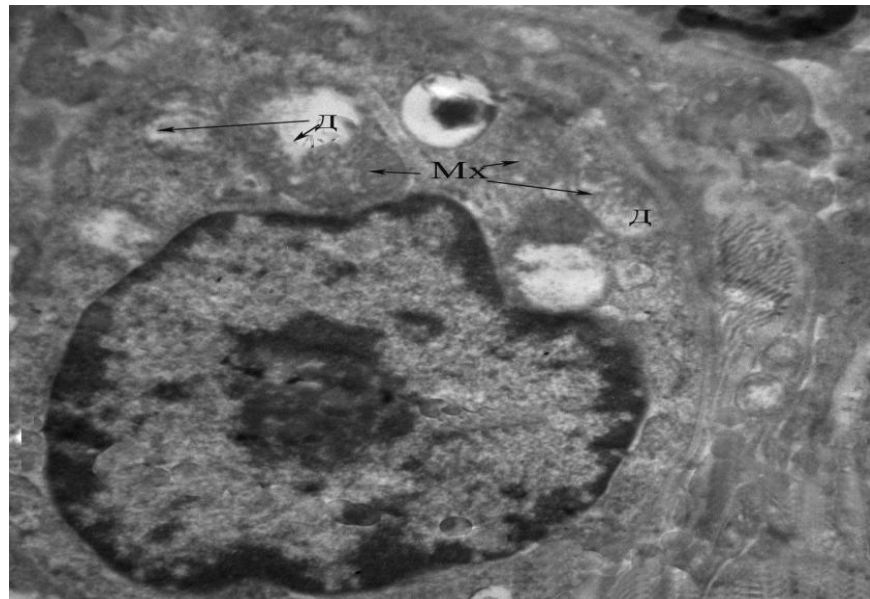
Примітки: \* - відмінності достовірні відносно 1 до 2 (p<0,05); # - відмінності достовірні відносно 4 до 2 (p<0,05); а – кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

Вплив ГГ після такого режиму ІГТ проявлявся у зсуві динамічної рівноваги Мх з перевагою процесів злиття. Під час злиття (fusion) мітохондрії поєднують свої мембрани та обмінюються вмістом мітохондріального матриксу, тим самим відновлюючи свою ультраструктуру



та зменшуючи кількість пошкоджених органел, тобто сприяючи оптимізації енергетичної функції Мх [62, 103] та попереджуючи можливість небезпечних наслідків генетичних мутацій [42].

Після ІГТ з 12%  $O_2$  в  $N_2$  і додаткової ГГ на електронограмах було визначено гетерогенність мітохондріальної субпопуляції, навіть у межах одного альвеолоциту (див. Рис.4.4.). Така гетерогенність була зумовлена, в більшій мірі, наявністю як Мх з різним ступенем вакуолізації, так і відносно неушкоджених органел.



**Рисунок 4.4 - Ультраструктурні особливості Мх легень після ІГТ з 12%  $O_2$  в  $N_2$  + ГГ. Умовні позначення: Мх- мітохондрії, Д- деструкція Зб. 9600.**

Отже, ознаки гіпоксичного стану Мх легень все ж мають місце, про що свідчать не тільки дані електронограм, а і статистичні зміни (див. Табл.4.3.) середнього діаметру Мх після ІГТ з 12%  $O_2$  в  $N_2$  + ГГ. Так, цей показник був достовірно нижчим у легенях тварин цієї групи, порівняно із ГГ, та достовірно не змінювався по відношенню до ІГТ з 12%  $O_2$  в  $N_2$ , залишаючись достовірно вищим від контрольного.

Таким чином, дія ГГ виявила, що адаптивні потужності

мітохондріального апарату легень під час ІГТ з 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> «напрацьовуються» за рахунок активізації біогенезу Мх, динамічних змін (злиття) та переважання у мітохондріальній популяції неушкоджених органел, хоча ознаки гіпоксичного стану легень все ж мали місце.

Гострий гіпоксичний стимул у легенях тварин, попередньо тренуваних за допомогою другого режиму ІГТ - із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> - призвів до достовірного зростання загальної кількості Мх (на 15%), по відношенню до ГГ (Табл.4.4.) та не мав достовірних змін по відношенню до ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>.

Варто зазначити, що подібний характер змін спостерігався і при ІГТ з 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> +ГГ. Однак, кількість структурно змінених Мх після ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> +ГГ була достовірно вищою (на 45%) по відношенню до ГГ та на 20% – по відношенню до ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. Збільшення структурно-змінених Мх, як і зростання гетерогенності серед мітохондріальної субпопуляції, ряд авторів [108, 165] розглядають як поглиблення деструктивного процесу внаслідок накопичення АФК (в даному випадку при гіпоксії) та пошкодження мембран Мх [88].

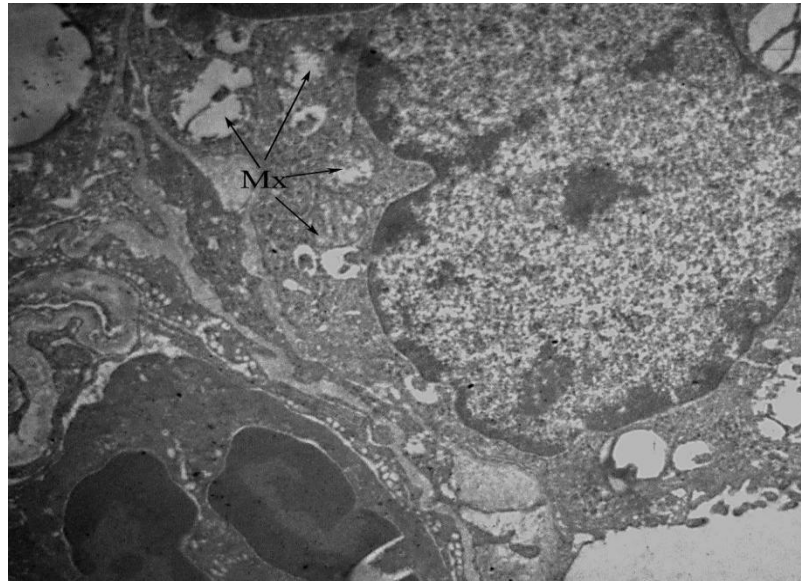
Таблиця 4.4.

**Стереометричні характеристики мітохондрій легень після застосування ІГТ з 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> та тестуючої дії ГГ (M±m, a=150)**

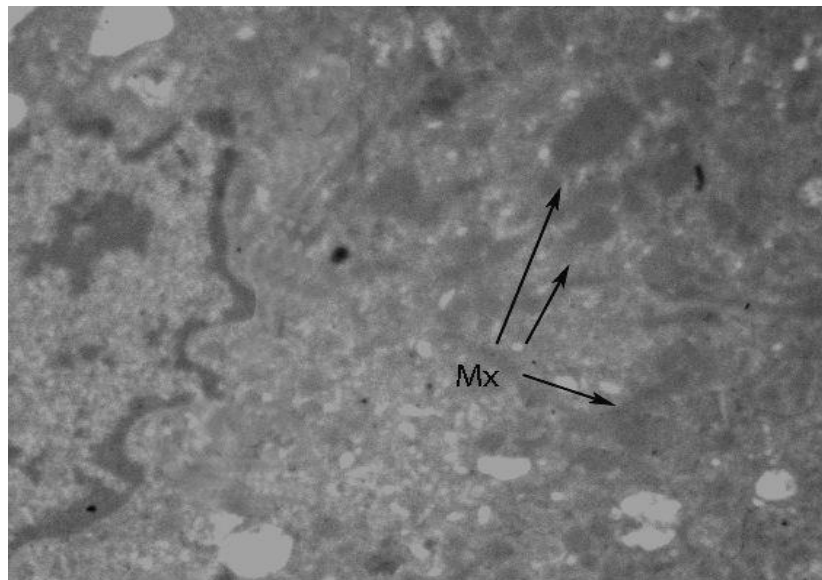
Умови експерименту	Загальна кількість Мх, од./мкм <sup>2</sup>	Кількість структурно змінених Мх, %	Середній діаметр Мх, мкм	Сума поверхонь Мх в одиниці об'єму тканини Si <sub>tot</sub> , мкм <sup>2</sup>
1.Контроль	9,6±0,2	4,6±0,5	0,39±0,01	5,7±0,5
2.ГГ - 7%O <sub>2</sub> 30хв	15,1±0,6*	18,7±0,7*	0,51±0,02*	8,0±0,2*
3.ІГТ 7% O <sub>2</sub>	19,0±0,7*	27,3±1,2*	0,68±0,05*	9,1±0,4*
4.ІГТ 7% O <sub>2</sub> + ГГ	20,1±0,1*#	34,0±2,6*##	0,71±0,05*#	8,6±0,3*

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.

Дійсно, на електронограмах легень цієї групи тварин прослідковується чітко виражена гетерогенність мітохондріальної популяції. Поряд із Мх з різним ступенем вакуолізації, просвітленим матриксом та пошкодженням внутрішньої мембрани (подекуди із повним її «розчиненням») (Рис 4.5.а) зустрічаються дрібні органели із затемненим матриксом (Рис. 4.5.б), як округлої так і вираженої повздовжньої форми.



а



б

**Рисунок 4.5 - Мозаїчність ультраструктурних зміни Мх в тканині легень після ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> + ГГ. Умовні позначення: Мх – мітохондрії.**

Зменшення розміру Мх, кількості крист та затемнення їх матриксу вказує на зниження енергетичного потенціалу цих органел [67] а також, на активацію гліколітичного синтезу АТФ.

Варто відмітити, що альвеолоцити з такими Мх мають електронно щільний затемнений цитозоль (див. Рис. 4.5.б), що може вказувати на ініціацію їх апоптичних змін [10, 35, 49]. Апоптоз - один із типів клітинної загибелі, характерною ознакою якої є ініціація дроблення (fission) Мх, що є наслідком збільшення рівня експресії Drp1/Dnm1 та зниження рівня експресії мітофузинів [62]. Пізніше, в апоптозному каскаді відбувається зміна експресії OPA1/Mgm1 в межах внутрішньої мембрани Мх. Як тільки відбувається зміна експресії OPA1, виникають порушення цілісності крист, вивільнення цитохрому с і активація каспаз, що веде до подальших деструктивних змін у Мх [74, 102, 123].

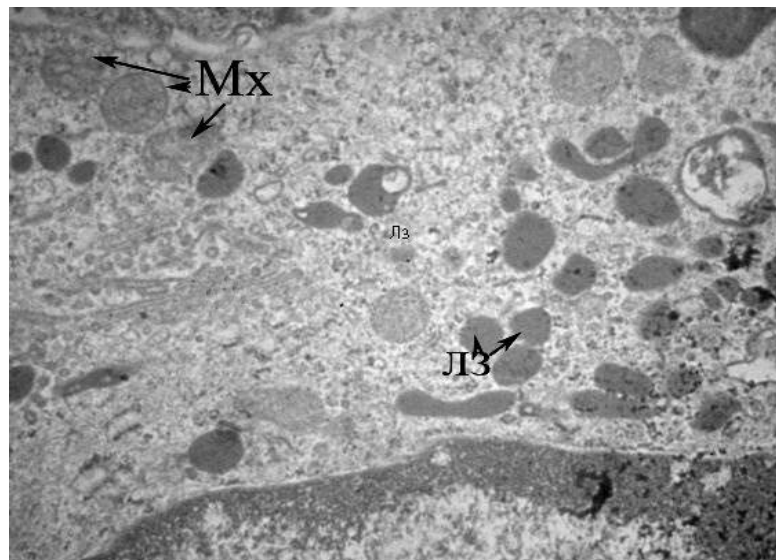
Отже, можемо зробити логічне припущення відносно того, що за допомогою ГГ вдалося виявити, що режим ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> сприяє зростанню мітохондріальної популяції у легенях тренуваних тварин, однак, поряд із цим підвищується гетерогенність Мх і відсоток пошкоджених органел. Характер пошкодження носить мозаїчний характер, і деякі Мх мають всі ознаки, що характерні для стадії незворотніх змін [35].

Величина середнього діаметру Мх у легенях тварин цієї групи мала тенденцію до зростання, порівняно із ІГТ із 7% O<sub>2</sub>, головним чином, за рахунок подальшого збільшення відсотка вакуолізованих органел серед мітохондріальної популяції, про що свідчать і електронограми легень у тварин цієї групи. Однак, цей показник був достовірно вищим по відношенню до тварин, що піддавалися ГГ (див. Табл. 4.4). Така динаміка вказує на поглиблення гіпоксичного стану та збільшення вакуолізації органел внаслідок зростання проникності мембран Мх, пошкодження їх цілісності.

Зменшення величини Si<sub>tot</sub> на 5,5% після дії ГГ на фоні проведеного ІГТ із 7% O<sub>2</sub>, порівняно із Мх легень після ІГТ із 7% O<sub>2</sub> є, скоріш за все,

наслідком пошкодження мембран Мх при такому додатковому гіпоксичному впливі та вказує на ймовірне зниження енергетичних процесів у Мх. Однак, показник  $Si_{tot}$  після ІГТ із 7%  $O_2$  +ГГ (див. Табл.4.4.) був вищим (на 7 %) від такого після 30-ти „чистої” хвилинної ГГ. Це вказує на те, що трьохтижнєве гіпоксичне тренування із 7% кисню у вдихуваній суміші газів призвело до збільшення площі мембран Мх у тканині легень і цим самим «пом'якувало» деструктивний вплив додаткового гіпоксичного навантаження.

Не однозначними виглядали і динамічні зміни мітохондріального апарату легень. Так, у альвеолоцитах, де переважали Мх із просвітленим матриксом, спостерігали виражені процеси злиття органел, тоді як у деяких альвеолоцитах спостерігали розміщені поодинокі Мх із практично збереженою структурою (Рис.4.6), однак в таких клітинах була велика кількість лізосом.



**Рисунок 4.6 - Особливості структурно-динамічних змін мітохондріального апарату легень після ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  +ГГ. Умовні позначення: Мх - мітохондрії, ЛЗ - лізосоми. Зб. 6900 .**

Це може вказувати на те, що одним із важливих механізмів у пристосуванні до ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою, що

обтяжується додатковим гіпоксичним навантаженням може бути активізація процесів злиття Мх, а з іншого - процесів аутолізу пошкоджених Мх. Саме тому, це вказує на важливість подальшого вивчення особливостей роботи мітохондріального конвеєру [109, 115], оскільки його злагоджена робота є одним із механізмів пристосування до гіпоксії.

Таким чином, застосування ГГ показало, що режим ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  також ініціює біогенез Мх, однак, перевага деструктивних змін у мітохондріях легень тварин цієї групи вказує на зниження інтенсивності енергетичних процесів.

Аналіз стереометричних та морфологічних даних вказує на те, що після проведеного ІГТ із 12% кисню у вдихуваній суміші та додаткової ГГ окрім процесів біогенезу у Мх мають місце активні динамічні зміни, зокрема процеси злиття. Поряд із цим, дещо зменшується ступінь вакуолізації органел. Хоча ознаки гіпоксичного пошкодження все ж мають місце після застосування ГГ на тлі ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ , отримані дані морфостереометричного дослідження вказують на наявність «адаптивного резерву», що проявляється у недостовірних змінах стереометричних характеристик Мх при застосуванні ГГ у тренуваних тварин на відміну від значних зсувів цих параметрів при дії ГГ на нетренованих щурів.

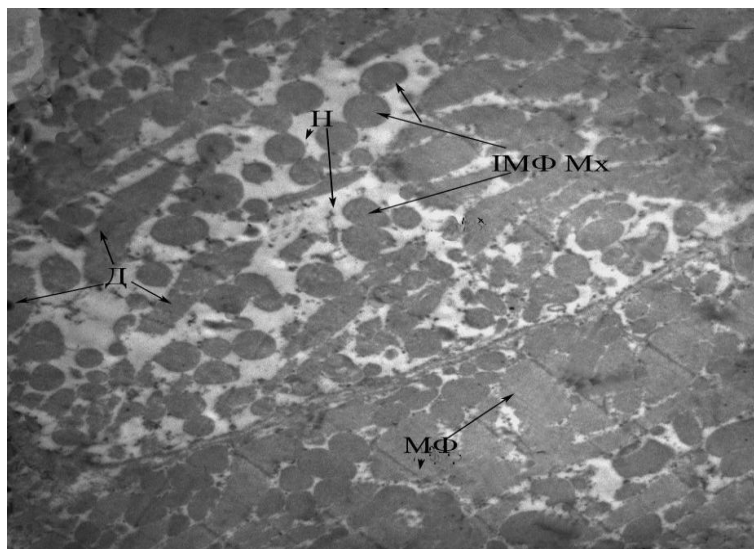
Дія ГГ на Мх легень тварин, тренуваних із застосуванням 7%  $O_2$  в  $N_2$ , також виявила деякий тренуючий вплив такого режиму за рахунок зростання мітохондріальної маси легень, але все ж, зростання кількості вакуолізованих органел із майже відсутньою внутрішньою мембраною (мітоптоз внутрішньої мембрани [164]), активізація динаміки Мх, збільшення гетерогенності мітохондріальної популяції та суттєві деструктивні зміни самих Мх вказують на розвиток важкого гіпоксичного стану легень та дозволяють дійти висновку, що такий режим ІГТ є більше пошкоджуючим, ніж адаптивним.

Спільними рисами впливу ГГ на структуру Мх легень щурів на фоні попередньо проведених курсів ІГТ були: зростання кількості структурно-

змінених органел та зменшення показника  $Si_{tot}$ . Динаміка Мх мала різнонаправлений характер: ГГ, проведена після ІГТ із 12%  $O_2$ , викликала злиття Мх, тоді як ГГ, проведена після ІГТ із 7%  $O_2$  у вдихуваній суміші, ініціювала перевагу процесів дроблення Мх. Різнонаправлений характер впливу мала ГГ і на діаметр Мх - ІГТ із 12%  $O_2$  +ГГ демонструвало тенденцію до зниження середнього діаметру Мх, а ІГТ із 7%  $O_2$  +ГГ - його зростання. Отже, ГГ, застосована після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ , виявила у легенях щурів наявність виражених адаптивних перебудов у структурі Мх, тоді як ГГ, застосована після ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$ , лише посилила вираженість деструктивних змін мітохондріального апарату, характерних для важкого гіпоксичного стану.

Морфологічні ознаки гострого гіпоксичного впливу у міокарді тварин, яких попередньо тренували ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  носили виражений мозаїчний характер (Рис. 4.7) 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.

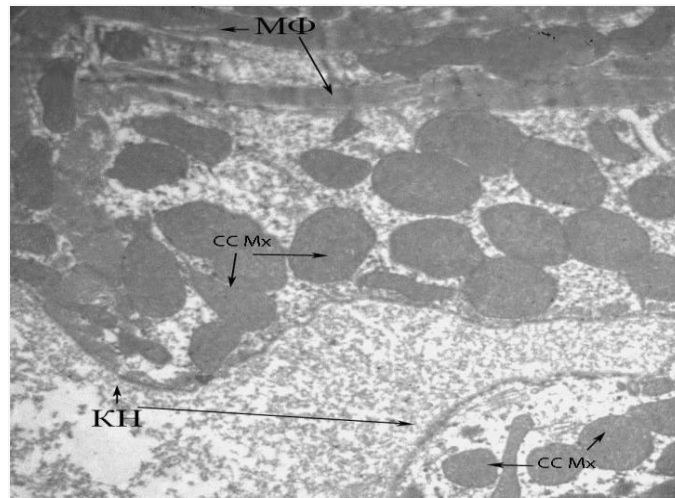
Мх в кардіоміоцитах у цієї групи тварин були, переважно дрібні і мали округлу форму із чітко окресленою зовнішньою мембраною. У місцях суттєвого лізису міофібрил поодинокі зустрічалися Мх із дискомплексованими кристами, однак без вакуолізації (що характерним є для Мх легень при такому впливі). У кардіоміоцитах, де зберігалася цілісність міофібрил, спостерігалася насиченість рибосомами, що вказує на активні синтетичні процеси в клітині



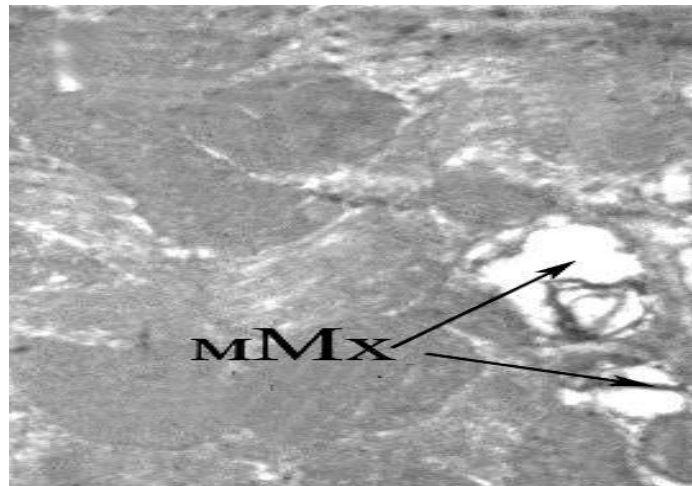
**Рисунок 4.7 - Особливості ультраструктури мітохондріального апарату кардіоміоцитів після ГГ, застосованого на тлі ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. Умовні позначення: ІМФ Мх - інтраміофібрилярні Мх, МФ – міофібрили, Н – набряк, Д – деструкція. Зб. 6000.**

Варто підкреслити, що відсоток вакуолізованих органел був значно меншим у міокарді, порівняно із Мх легень. Більш того, ГГ на фоні раніше проведеного ІГТ не впливала на кількість структурно-змінених Мх. Однак, все ж таки залишалися ознаки гіпоксичного стану міокарда, що виражалися у мозаїчному пошкодженні та лізису міофібрил, перикапілярному набряку та утворенні «ворсинок сарколеми», в яких знаходилися СС Мх. Поодинокі (але частіше) зустрічалися Мх з вираженими ознаками мієлінізації (Рис. 4.8.б) (як і після ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>), що вказує на нездатність таких Мх здійснювати свою енергетичну функцію [45].





а



б

**Рисунок 4.8 - Особливості ультраструктури мітохондріального апарату кардіоміоцитів після ГГ, застосованого на тлі ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. Умовні позначення: Імф Мх - інтраміофібрилярні Мх, СС Мх - субсарколемальні Мх, МФ - міофібрили, мМх - мієлінізовані Мх, КН – краєвий набряк кардіоміоцита. Зб. 9600 (а), 20000 (б).**

Дія ГГ на тлі проведеного трьохтижневого ІГТ із 12% O<sub>2</sub> у міокарді тренуваних щурів призвела до достовірного зростання (на 20%) загальної кількості Мх у ІМФ фракції, порівняно із ІГТ із 12% O<sub>2</sub> (Табл.4.5), що вказує на активні процеси біогенезу Мх. Вплив ГГ на Мх міокарда після курсу ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> (Табл. 4.6.) характеризувався зниженням їх загальної кількості

(на 8,5% у СС фракції Мх та на 12,3% у ІМФ Мх), порівняно із ІГТ із 12% O<sub>2</sub>.

Таблиця 4.5

**Стереометричні характеристики мітохондрій міокарда після застосування ІГТ з 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> та тестуючої дії ГГ (M±m, a=150)**

Умови експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од./мкм <sup>2</sup>		Кількість структурно змінених мітохондрій, %		Середній діаметр мітохондрій, мкм		Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини, мкм <sup>2</sup>	
	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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> + 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 4 до 2 (p<0,05); \*\* - відмінності достовірні відносно 3 до 4 (p<0,05); a – кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.

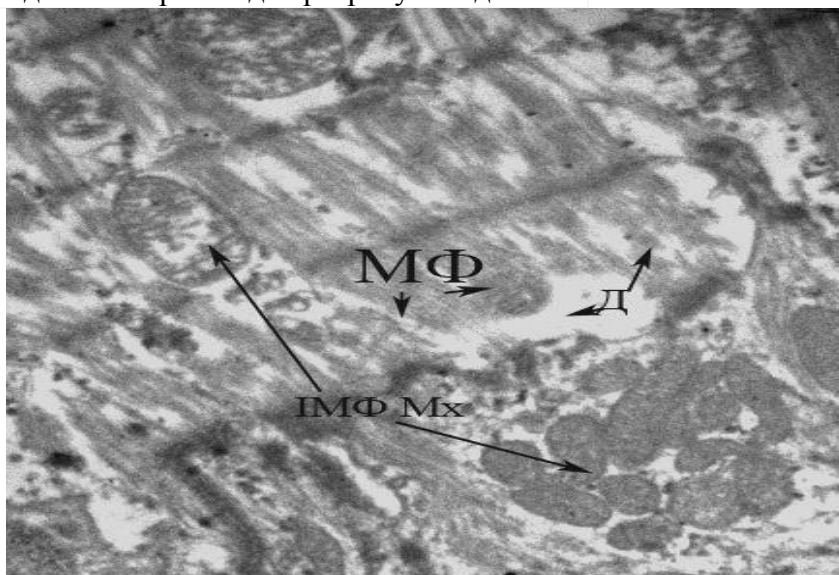
Спостерігалось зростання кількості структурно-змінених органел (ІМФ Мх - на 8,3% порівняно із ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> та на 40, 7% ІМФ Мх і 45,2% СС Мх, порівняно з ГГ). Поряд із цим достовірно зростала (на 42,2%) величина середнього діаметру у СС Мх, та величина Si<sub>tot</sub> у ІМФ Мх (на 22,6%) порівняно з ГГ. Такі суттєві відміна у величині середнього діаметру і Si<sub>tot</sub> між мітохондріальними субпопуляціями, скоріш за все, обумовлена перевагою процесів fusion у ІМФ фракції Мх (Рис.4.9.), направлених на підтримку енергетичної функції органел та відновлення пошкоджених [62, 103]. На електронограмах прослідковувалося утворення Мх «некласичної» форми

Таблиця 4.6

**Стереометричні характеристики мітохондрій міокарда після застосування ІГТ з 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> та тестуючої дії ГГ (M±m, a=150)**

Умови експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од./мкм <sup>2</sup>		Кількість структурно змінених мітохондрій, %		Середній діаметр мітохондрій, мкм		Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини, мкм <sup>2</sup>	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
1.Конт роль	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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> +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 1 до 2 (p<0,05);# - відмінності достовірні відносно 4 до 2 (p<0,05); \*\* - відмінності достовірні відносно 3 до 4 (p<0,05); а – кількість випадково вибраних для розрахунків ділянок.



**Рисунок 4.9 - Структурно-динамічні зміни Мх ГГ, застосованого на тлі ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. Умовні позначення: ІМФ Мх, Д - деструкція, МФ - міофібрила 3б. 12000.**

Мх обох субпопуляцій міокарда у тварин цієї групи мали електронно-щільний матрикс. Якщо взяти до уваги той факт, що ознакою інтенсифікації гліколітичних процесів в Мх є зменшення оптичної щільності їх матриксу [49], ущільнення мітохондріального матриксу ймовірно, вказує на те, що не відбувалося суттєвої активації гліколізу. Щодо динамічних змін Мх міокарду після ГГ, проведеної на тлі ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$ , то в СС фракції мали місце як процеси злиття, так і процеси дроблення, тоді як в ІМФ Мх процеси злиття Мх були домінуючими, особливо в місцях лізису міофібрил.

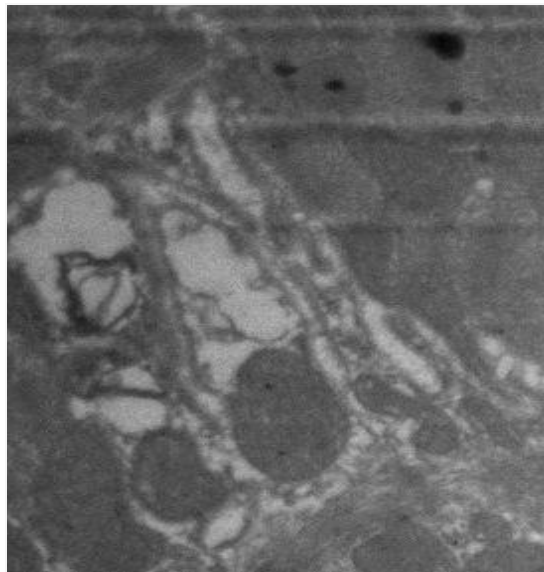
Варто відмітити, що ми практично не спостерігали процесів fission серед ІМФ Мх, натомість, поміж міофібрилами була чітко виражена гетерогенність Мх у міокарді цієї групи тварин поодинокі зустрічалися мієлінізовані Мх (Рис.4.10 а), вигнуті стрічкоподібні Мх (Рис.4.10 б) (такі часто зустрічалися у вигляді «черги біля ядра», Мх (в) із чітко обмеженою «вакуолею» всередині органели та Мх із практично відсутньою внутрішньою мембраною (Рис.4.10 г).

Поява Мх «некласичної» форми свідчить про динамічну перевагу процесів fusion серед ІМФ Мх, що носить компенсаторний характер, але поява Мх з чітко обмеженою вакуолею з електронно-прозорим вмістом може вказувати на один із механізмів відокремлення пошкодженої ділянки у Мх [45].

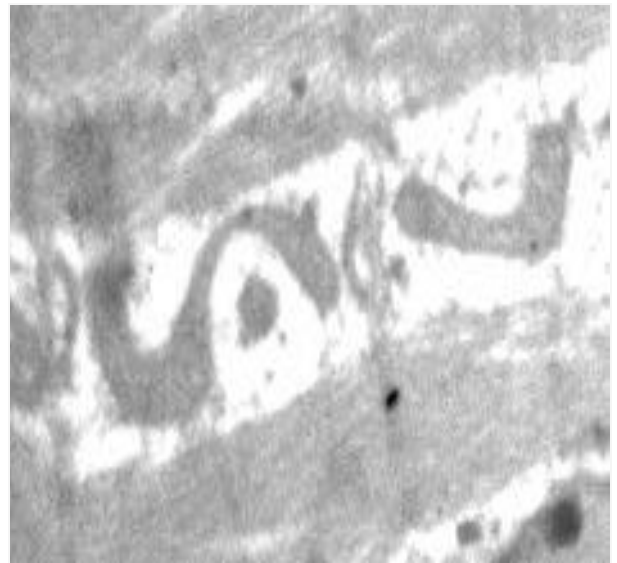
Отже, ГГ після ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  призводить до зростання кількості Мх у міокарді, за рахунок активізації біогенезу та зсуву динамічної рівноваги Мх у бік злиття. При цьому, кількість структурно-змінених СС Мх (див. Табл.5.7.) достовірно знижується на 6,2%, а ІМФ Мх на 7,3% по відношенню до ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ . По відношенню до ГГ, кількість структурно-змінених ІМФ Мх у тварин цієї групи є достовірно нижчим на 34%.

Враховуючи вище сказане, можемо дійти підвисновку, що у міокарді щурів, яких попередньо три тижні тренували ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  ГГ

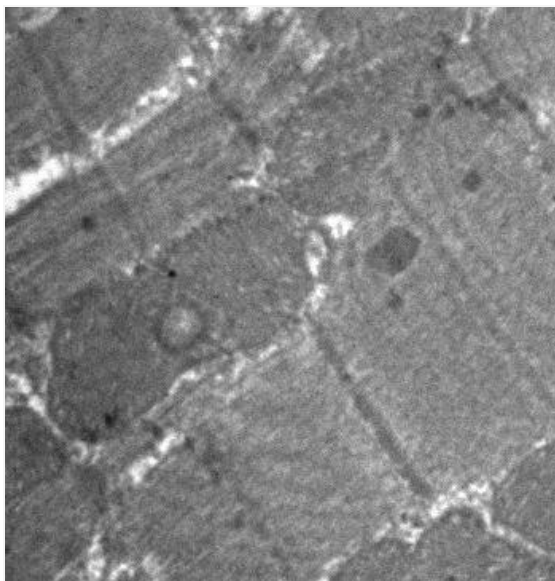
викликала зростання мітохондріальної маси та зменшення кількості структурно-змінених органел, переважно, у ІМФ Мх



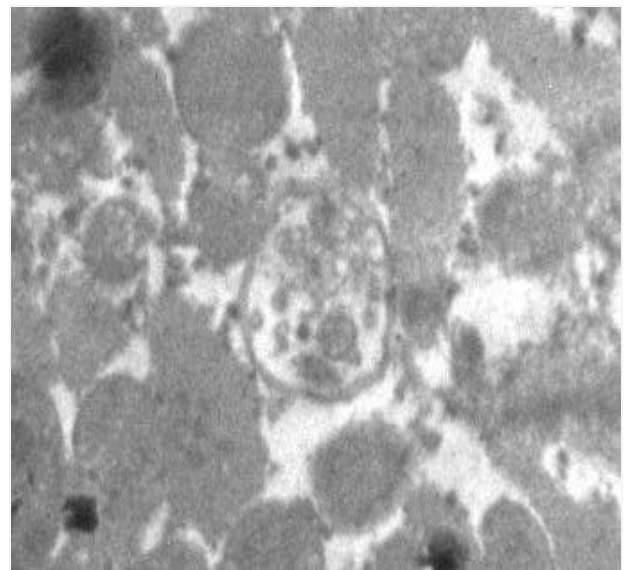
**а**



**б**



**в**



**г**

**Рисунок 4.10 - Ультраструктурні особливості Мх міокарду після ГГ, застосованого на тлі ІГГ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. а – утворення мієлінізованих Мх; б – поздовжна асоціація Мх, в – компартменталізація Мх, г – аутофагія Мх. Зб. 12500.**

. В той же час, середній діаметр достовірно знижувався на 24,5% у СС Мх, порівняно з ГГ (див. Табл.4.5), а величина суми поверхонь Мх в одиниці об'єму -  $Si_{tot}$  -достовірно знижувалася у обох субпопуляціях Мх (СС Мх- на 10,5% , ІМФ Мх - 6 %), по відношенню до ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ , що ймовірно, зумовлено зменшенням діаметру органел. З іншого боку, зменшення цього показника може свідчити про активацію роботи мітохондріального конвеєру [139]: найбільш пошкоджені органели вчасно утилізуються і активують біогенез «повноцінних» органел, тим самим, підтримуючи мітохондріальний гомеостазис та нарощуючи знижену дією ГГ енергетичну потужність.

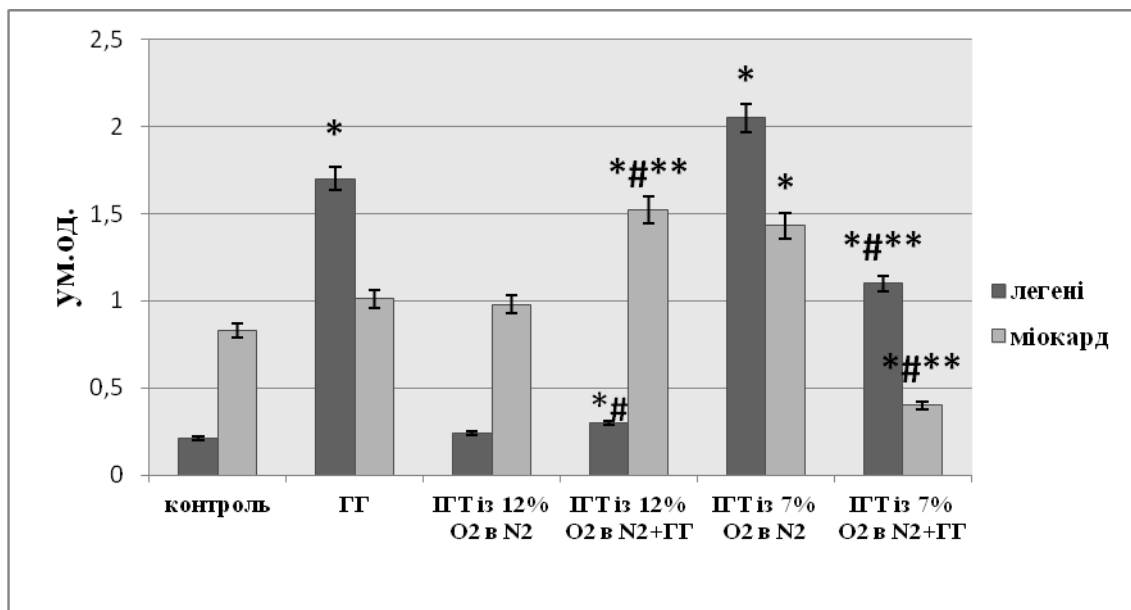
Таким чином, додатковий гіпоксичний стимул на тлі трьохтижневого ІГТ із 7%  $O_2$  у вдихуваній суміші газів викликав виражені динамічні зміни Мх, що проявлялися у перевазі процесів злиття (особливо серед ІМФ фракції) із утворенням відносно великих Мх атипової форми; появи мієлінізованих, стрічкоподібних Мх. У поєднанні із даними стереометричного дослідження - зменшення кількості органел (перевага процесів елімінації Мх над їх біогенезом [73]), збільшення кількості структурно-змінених органел та їх діаметру вказує на зниження енергетичної потужності Мх міокарда, і, лише зростання показника  $Si_{tot}$  може виступати претендентом на наявність компенсаторних процесів, напрацьованих під час такого жорсткого режиму ІГТ.

Отже, дія ГГ на міокард тварин, попередньо тренуваних досліджуваним курсами ІГТ призводила до моїзачних змін у кардіоміоцитах, що залежало від режиму ІГТ. Так, у тварин, яких попередньо три тижні тренували ІГТ із 12% кисню у вдихуваній суміші газів, ГГ викликала роз'єднання Мх, зменшення діаметру Мх та не супроводжувалася зростанням кількості пошкоджених органел. Тоді як після проведення курсу ІГТ із 7% кисню у вдихуваній суміші газів, тестуючи дія ГГ призводила до зростання кількості структурно-змінених Мх (особливо у ІМФ фракції) та появи мієлінізованих,

стрічкоподібних Мх та Мх «некласичної» форми. Динамічні зміни при цьому зсувалися у бік процесів злиття - особливо у місцях лізису міофібрил -що спричинило зростання розмірів Мх. Кількість Мх зменшилася, однак величина  $Si_{tot}$  зросла в обох субпопуляціях органел, що може вказувати на те, що більш жорсткий режим ІГТ може спричиняти свою адаптивну дію не тільки за рахунок зміни динамічних процесів Мх, а й за рахунок збільшення площі внутрішньої мембрани Мх - місця безпосереднього енергоутворення. Виражена перевага процесів злиття вказує на можливість міжмітохондріального обміну для оптимізації роботи пошкоджених гіпоксією Мх [65, 176], що є однією із ліній захисту мітохондріальної популяції [127].

#### 4.2. Рівні експресії мРНК NRF-1 в тканинах легень та серця при тестую чому гіпоксичному навантаженні

Рівні експресії досліджуваного гену у легенях тварин групи ГГ (дихання гострою гіпоксичною сумішшю 30 хв без ІГТ) мало у 8 разів вищі показники (Рис. 4.11) по відношенню до контролю, тоді як у міокарді - не мало достовірних значень відносно контрольних показників.



**Рисунок 4.11 - Вплив різних гіпоксичних стимулів на рівні експресії мРНК NRF-1 у легенях щурів.** \* - відмінності достовірні відносно контролю до ГГ ( $p < 0,05$ ); # - відмінності достовірні відносно ГГ до ІГТ 12% O<sub>2</sub>+ ГГ ( $p < 0,05$ ); \*\* - відмінності достовірні відносно ІГТ 12% O<sub>2</sub> до ІГТ 12% O<sub>2</sub>+ ГГ ( $p < 0,05$ ).

Тестуюча дія ГГ, застосована на тлі ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> у легенях та міокарді призвела до формування достовірно вищих рівнів експресії цього гену по відношенню до контролю (у легенях - у 5,3 рази, у міокарді – в 1,8 рази). У міокарді Мх цієї групи тварин були переважно дрібними, однак на відміну від легень ознак вакуолізації практично не мали, хоча в місцях лізису міофібрил зустрічалися Мх із дисконкомплексованими кристами (див. розділ



4.1.). Рівні експресії мРНК NRF-1 відносно групи ГГ після ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> + ГГ у легенях не мали достовірних змін (хоч і мала тенденцію на зниження), а у міокарді було на 33% вищим. Відносно ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> реєстрували достовірно вищі рівні експресії мРНК NRF-1 на 35% у міокарді та не спостерігали тенденцію на зростання рівнів експресії цього гену у легенях. Така виражена органоспецифічність в експресії одного із маркерів біогенезу ймовірно пояснюється тим, що у легенях відсоток Мх із пошкодженою внутрішньою мембраною був дещо вищим, порівняно із міокардом. Ці факти вказують на те, що легені є більш чутливими до гіпоксичного впливу і мають менші протективні властивості мітохондріального апарату, ніж міокард.

Тестуюча дія ГГ застосована на тлі ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою (ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>) у легенях мала достовірно вищі рівні експресії досліджуваного гену (на 81%), а у міокарді - достовірно нижчі (на 50%) показники відносно контрольних значень. Це вказує на те, що гострий гіпоксичний вплив, викликає ініціацію біогенезу Мх, причому більш виражено у легенях. Відносно групи ГГ рівні експресії досліджуваного гену у обох досліджуваних органах після застосування ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> + ГГ мали достовірно нижчі рівні експресії мРНК NRF-1 (легені - на 34%, міокард - на 60%). Відносно ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> рівні експресії мРНК NRF-1 мали також достовірно нижчі значення (у легенях - на 46%, у міокарді - на 71%). Такі дані дозволяють зробити припущення, що експресія цього гену якимось чином пов'язана із АФК, точніше високими їх концентраціями оскільки вакуолізація Мх є прямим наслідком зміни проникності мембран Мх внаслідок гіпоксії, а гіпоксичний стан завжди супроводжується високими рівнями АФК [160]. Відомо, що у більшості клітин, білки ДЛ вважаються головним сайтом продукції АФК і рівень їх продукції тісно пов'язаний із енергетичним станом клітини та залежить від величини мембранного потенціалу [165]. Значно нижчий ініціюючий вплив на рівні експресії цього

гену у міокарді на ультраструктурному рівні відображався у зростанні гетерогенності мітохондріальної популяції однак, відсоток вакуолізованих Мх, був значно нижчим, порівняно із легеньми.

Таким чином вплив тестуючого гіпоксичного навантаження на експресію мРНК NRF-1 носить виражений органоспецифічний характер і в легень і міокарді. Отримані результати свідчать про те, що додаткове навантаження у вигляді ГГ спровокувало падіння інтенсивності процесів біогенезу в обох тканинах, що свідчить про відсутність напрацьованого адаптивного резерву під час такого режиму ГГ (із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>) у обох досліджуваних тканинах. Варто зазначити, що для міокарду таке гіпоксичне навантаження мало досить критичні наслідки, тоді як у легень інтенсивність біогенезу Мх була вище контрольних показників. Можливо, це пов'язано із тим, що у легень рівні експресії цього фактору під час ГГ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> були вищими, ніж у міокарді, що може вказувати на те, що адаптивні можливості легень після такого режиму ГГ потужніші, ніж у міокарді.

#### **4.3. Зміни дихання і фосфорилювання у мітохондріях в тканинах легень та серця при тесту чому гіпоксичному навантаженні**

Дослідження тестуючого впливу ГГ на функціональний стан Мх легень (Табл. 4.7) дозволило виявити при окисненні СК вірогідне зростання швидкості фосфорилювального дихання (на 16,8%) та величини ДК (на 20%) на фоні зниження (на 23%) ефективності фосфорилювання по відношенню до контрольних значень. Достовірне збільшення значення АДФ-стимульованого дихання в стані V<sub>3</sub> може вказувати на інтенсифікацію окислювальних процесів у Мх легень при ГГ. А зниження ефективності фосфорилювання, може бути свідченням розвитку мітохондріальної дисфункції з меншою збалансованістю процесів окислювального фосфорилювання за цих умов.

Таблиця 4.7

Зміни показників дихання і фосфорилування мітохондрій легень після двох режимів ІГТ та ГТ

(M±m)

Умови експерименту	V <sub>3</sub> , нг атом О · хв <sup>-1</sup> , л, мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>4</sub> , нг атом О · хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	АДФ/О мкм АДФ/Н2 ат. О	V <sub>3</sub> , нг атом О · хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>4</sub> , нг атом О · хв <sup>-1</sup> , мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	АДФ/О мкм АДФ/Н2 ат. О
Субстрат окиснення – 10 ммоль/л сукцинату натрію								
1. контроль	40,0±2,41	19,1±2,72	2,12±0,13	1,61±0,17	32,1±2,51	12,9±2,37	2,48±0,19	2,45±0,14
2. 7% O <sub>2</sub> 30хв	46,7±2,92*	18,4±3,14	2,55±0,21*	1,24±0,16*	26,8±3,42*	12,7±2,72	2,11±0,16*	2,26±0,13
3 ІГТ із 12% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	35,2±2,11*	14,8±2,91	2,38±0,13	1,76±0,11	33,5±2,43*	11,9±2,08	2,82±0,12*	2,71±0,10*
4 ІГТ 12% O <sub>2</sub> + ГТ	45,2±3,84**	16,9±2,57#	2,67±0,14**	1,61±0,10#	31,8±2,59#	11,5±2,38	2,76±0,09#	2,78±0,10*#
1. контроль	34,3±3,12	15,3±2,87	2,25±0,09	1,48±0,11	25,0±3,14	10,1±2,88	2,48±0,12	2,28±0,13
2. ГТ 7% O <sub>2</sub> 30 хв	42,0±2,93*	16,5±3,11	2,58±0,12*	1,23±0,11*	21,8±3,21	9,8±2,62	2,24±0,10*	2,13±0,15
3 ІГТ із 7% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	26,9±4,07*	12,6±3,03	2,14±0,12	1,54±0,12	22,5±4,15	8,9±3,16	2,54±0,17	2,35±0,14
4 ІГТ 7% O <sub>2</sub> + ГТ	35,4±3,37#**	17,9±2,87	1,98±0,16*#	1,30±0,10**	18,7±3,87	7,9±2,97	2,37±0,15#	2,08±0,11**

Примітки: \* - відмінності достовірні відносно 1 до 2 (p&lt;0,05); # - відмінності достовірні відносно 4 до 2 (p&lt;0,05);

\*\*- відмінності достовірні відносно 3 до 4 (p&lt;0,05).

При споживанні НАД-залежних субстратів у гомогенаті міокарду реєстрували достовірне зниження величини ДК (15%) по відношенню до контролю на фоні відсутності достовірних змін інших показників дихання Мх.

Як відомо [36], Мх здійснюють дихальний контроль (ДК) до тих пір, поки можуть обмежувати транспорт електронів за допомогою електрохімічного градієнту, що створюється на внутрішній мембрані Мх. Якщо градієнт порушується внаслідок пошкодження мембран Мх, то ДК усувається і транспорт електронів може йти вільно. Відповідно, зниження величини ДК після дії ГГ може свідчити про падіння електрохімічного градієнту на внутрішній мембрані Мх та про зниження енергетичного стану клітини.

Таким чином, при окисненні НАД-залежних субстратів у Мх легень при ГГ має місце зниження показників дихання Мх, що може свідчити про пригнічення інтенсивності окиснення НАД-залежних субстратів. Отже, за умов ГГ відбувається перемикавання енергетичного забезпечення на швидкий сукцинатоксидазний шлях дихання Мх.

Активація окислення СК за цих умов, насамперед, визначається можливістю швидкого поновлення його пулу за рахунок переамінування, за участю ферменту аспартатамінострасферази, глутамінової та щавелевооцтової кислот з наступним окисним декарбоксилюванням  $\alpha$ -кетоглутарату до сукцинату, що дозволяє обминати „вузькі” місця циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [33, 105].

Таким чином, отримані результати підтверджують положення, сформульовані Л.Д. Лук'яною про те, що саме зі зниженням функціонування Мх на субстратній, а не на термінальній ділянці дихального ланцюга, починається порушення утилізації кисню в останньому у відповідь на дію низки несприятливих чинників, в тому числі і гіпоксію [117].

Вплив ГГ, відображається як на морфо-функціональних, так і на генетично обумовлених змінах Мх, а забезпечення енергетичних потреб відбувається, в більшій мірі, за рахунок підвищення інтенсивності енергетичних процесів у Мх при окисненні ФАД-залежних субстратів. Дія ГГ на легені контрольних тварин є досить агресивною, але адаптивні зміни Мх все ж переважають над деструктивними, хоча вже мають місце «перші дзвоники» клітинної загибелі.

При вивченні впливу ГГ на функціональні показники Мх міокарду (Табл. 4.8.) слід зазначити, що як і в легенях, швидкість АДФ-стимульованого дихання залежала від субстрату окиснення.

Так, за умов дії ГГ у інтактних тварин при окисненні ФАД-залежного субстрату достовірно зростала швидкість фосфорилювального дихання (на 47%), а величина ДК зростала на 10%. При НАД-залежному окисненні вірогідно знижувався (на 11%) показник ДК, порівняно із контролем, тоді як інші величини достовірно не змінювалися. Таким чином, при ГГ у міокарді має місце перемикання енергетичного забезпечення на використання високоенергетичних субстратів обміну, пов'язаних із переважним окисненням СК.

Таблиця 4.8.

Зміни показників дихання і фосфорилування мітохондрій міокарду після двох режимів ІГТ та ІГТ

(M±m)

Умови експерименту	V <sub>3</sub> , нг атом О . хв <sup>-1</sup> . 1. мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>4</sub> , нг атом О . хв <sup>-1</sup> . мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	АДФ/О мкм АДФ/Н2 ат. О	V <sub>3</sub> , нг атом О . хв <sup>-1</sup> . мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>4</sub> , нг атом О . хв <sup>-1</sup> . мг <sup>-1</sup> білка	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	АДФ/О мкм АДФ/Н2 ат. О
Субстрат окиснення – 10 ммоль/л сукцинату натрію								
1. контроль	60,2±3,45	21,9±2,93	2,75±0,14	1,50±0,11	54,3±3,76	22,0±2,57	2,47±0,11	2,32±0,11
2. 7% O <sub>2</sub> 30хв	88,7±3,48*	29,1±3,11*	3,03±0,13	1,33±0,12*	47,6±3,48	21,34±2,87	2,23±0,11*	2,14±0,10
3. ІГТ із 12% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	52,6±2,88*	17,8±2,51	2,96±0,12	1,67±0,10	60,7±4,10	20,4±2,92	2,98±0,12*	2,78±0,11*
4. ІГТ 12% O <sub>2</sub> + ІГТ	73,3±3,12*#**	22,6±2,57#	3,24±0,13**	1,64±0,11#	65,5±3,37*#	23,2±2,70	2,82±0,14*#	2,61±0,12*#
1. контроль	41,81±3,44	17,0±2,74	2,45±0,18	1,57±0,12	40,8±3,87	13,0±2,44	3,13±0,14	2,46±0,12
2. 7% O <sub>2</sub> 30хв	59,1±2,17*	21,5±2,72*	2,75±0,10*	1,38±0,13	36,8±3,72	14,2±2,51	2,58±0,17*	2,32±0,14
3. ІГТ із 7% O <sub>2</sub> в N <sub>2</sub>	33,6±3,88*	14,4±2,92	2,33±0,17	1,62±0,12	35,0±2,28	10,8±2,88	3,24±0,11	2,53±0,10
4. ІГТ 7% O <sub>2</sub> + ІГТ	44,0±3,72*#**	18,9±2,88#	2,33±0,16#	1,37±0,11**	25,5±3,12*#**	8,8±2,48#	2,92±0,13*#**	2,32±0,08**

Примітки: \* - відмінності достовірні відносно 1 до 2 (p&lt;0,05); # - відмінності достовірні відносно 4 до 2 (p&lt;0,05);

\*\* - відмінності достовірні відносно 3 до 4 (p&lt;0,05).

Отримані дані свідчать про те, що за умов ГГ у інтактних тварин збільшується внесок сукцинатоксидазного шляху, порівняно із НАДН-оксидазним, у загальний потік електронів дихального ланцюга, оскільки він менш чутливий до дефіциту кисню [116]. За гіпоксичних умов сукцинат нартію нагромаджується у тканинах, що робить його більш доступним для окиснення [34].

Раніше вважали [21], що у випадку переходу клітини від спокою до активації фізіологічних функцій зберігається однакова послідовність реакцій циклу Кребса. Оскільки найбільш „повільними” ферментами циклу є початкові – цитратсинтаза і ізоцитратдегідрогеназа, то рівень їх активності повинен був би визначати загальну швидкість протікання цього циклу. Проте, було встановлено [34], що підвищення функціональної активності клітини супроводжується, переважно, окисненням лише одного із інтермедіатів циклу трикарбонових кислот (ЦТК) – СК.

Підсумовуючи вище наведені дані впливу ГГ на показники дихання Мх легень і міокарду нетренованих тварин, можемо констатувати, що ГГ в обох тканинах викликає одно направлені зміни енергетичного метаболізму. Привертає увагу той факт, що за умов окислення СК, показник ефективності використання кисню (АДФ/О) Мх легень знижувався на 23%, в той час як у Мх міокарду – на 11%. При окисленні НАД- залежних субстратів, спряження процесів дихання і фосфорилування у Мх легень за умов дії гострої гіпоксії знижувалася на 15%, у Мх міокарда - на 10%. Отже, для Мх легень вплив ГГ є більш критичним, ніж для Мх міокарду, а також свідчить про те, що процеси енергетичного забезпечення у цих тканинах відбуваються за умов різного ступеня збалансованості між процесами дихання і фосфорилування в Мх.

З літератури відомо [26], що за допомогою ІГТ можна впливати на активність дихальних ферментів Мх. Проведене нами тестування тварин ГГ після курсу ІГТ із 12% О<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> дозволило нам виявити значну протекторну

роль адаптаційних механізмів енергозабезпечення Мх легень.

Так, при споживанні ФАД-залежних субстратів вони полягали у (див.Табл. 4.7) вірогідному зростанні швидкості фосфорильовального дихання (на 28%) та спряження дихання із фосфорилуванням (на 12%) по відношенню до ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ ; у вірогідному зниженні швидкості контрольованого дихання (на 9%) та зростанні ефективності фосфорилування (на 23%) порівняно із показниками при «чистій» ГГ.

При споживанні НАД-залежних субстратів достовірних змін показників дихання Мх легень по відношенню до ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  не реєстрували, що свідчить про перемикання енергетичного забезпечення на сукицнатооксидазний шлях окиснення. Однак, по відношенню до дії ГГ спостерігали достовірне зростання швидкості фосфорильовального дихання (на 16%), величини ДК (на 24%) та АДФ/О (на 19%). Отримані дані вказують на те, що адаптивний ефект ІГТ із помірною гіпоксичною складовою на Мх легень полягав у підвищенні резистентності дихального ланцюга до ГГ за рахунок збільшення швидкості фосфорильовального дихання та спряження дихання із фосфорилуванням на фоні зростання ефективності використання кисню Мх легень. Зростанню процесів фосфорилування та споживання кисню сприяло збільшення рівня експресії одного з ключових маркерів біогенезу Мх - NRF-1 (див. Рис. 4.11) та, ймовірно, як наслідок, зростання сумарної площі мембран Мх - місця розташування білків електрон-транспортного ланцюга.

Вивчення стану енергетичного метаболізму за умов дії ГГ на тлі ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  при окисненні СК (див. Табл. 4.7) виявило вірогідне зростання швидкості фосфорильовального дихання (на 24 %) та коефіцієнту АДФ/О (на 16%) а також вірогідне зниження коефіцієнта АДФ/О (на 11,5%) порівняно із ІГТ із 7%  $O_2$  при окисненні НАД-залежних субстратів у Мх легень. Таким чином, тестуюча дія ГГ, застосована на тлі ІГ із більш жорсткою гіпоксичною складовою, дозволила встановити перевагу



сукцинатоксидазного шляху окиснення в Мх легень, що вказує на регуляторне перепрограмування роботи ДЛ через пригнічення електрон-транспортної функції МФК I і компенсаторної активації МФК II [23]. Ефект такої зворотної інактивації ЕТЛ в умовах гіпоксії є однією з трьох стадій розвитку мітохондріальної дисфункції [117]. ГГ у Мх легень тварин тренуваних ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$ , лише прискорила перебіг деструктивних змін, які були набуті під час трьохтижневого тренування.

На розвиток енергетичної дисфункції вказує і зниження спряження процесів окиснення із фосфорилуванням та ефективності фосфорилування у Мх легень. На ультраструктурному рівні такий енергетичний «дисбаланс» виражався у зростанні гетерогенності Мх популяції із перевагою вакуолізованих органел, що мали кристи різного ступеня дисконкомплексації. Також з'являлися альвеолоцити із дрібними Мх (із електронно-щільним вмістом) та конденсованим хроматином біля ядерної мембрани, що вказує на ініціацію апоптичних змін у них. Рівень експресії NRF-1 падав і корелював із зниженням сумарної площі мембран Мх.

Аналіз хроноамперометричних кривих показав, що тестуюча дія ГГ, застосована на тлі ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  у Мх міокарду (див. Табл. 4.8.) викликала активацію адаптивних механізмів енергетичного метаболізму. Так, при окисненні СК реєстрували вірогідне зростання швидкості фосфорилувального дихання (на 39%) та ДК (на 9,3%), порівняно із ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ . При цьому, показник ефективності використання кисню не зазнавав достовірних змін. Відсутність достовірних змін показників енергетичного забезпечення міокарду при окисненні НАД-залежних субстратів (по відношенню до ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ ) свідчить про перевагу сукцинатоксидазного шляху енергетичного забезпечення за цих умов за рахунок зростання інтенсивності фосфорилувального дихання та спряження дихання із фосфорилуванням.

Вірогідне зниження АДФ-стимульованого дихання в стані  $V_3$  (на

17,4%), V4 (на 22%), зростання коефіцієнту АДФ/О (на 19%) при окисненні СК та вірогідне зростання АДФ-стимульованого дихання в встані V<sub>3</sub> (на 27%), ДК (на 21%) та коефіцієнту АДФ/О (на 18%) при окисненні глутамату з малатом (по відношенню до ГГ) вказують на те, що ефективність адаптивних механізмів енергетичного забезпечення при ІГТ із помірною гіпоксичною складовою полягає у вираженому зростанні споживання кисню, спряження дихання із фосфорилуванням та ефективності використання кисню більш виражена при НАД-залежному окисненні.

Оцінка ефективності ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою за допомогою ГГ у Мх міокарду виявила вірогідне зростання (на 24%) швидкості фосфорилувального дихання на фоні зниження ефективності фосфорилування (на 15%) при окисненні СК порівняно із ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. Вірогідне зниження (порівняно із ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>) швидкості фосфорилувального дихання (на 27%), ДК (на 9%) та АДФ/О (на 8%) при окисненні глутамату і малату натрію вказує на послаблення НАД-залежних енергетичних процесів у Мх міокарду, яке виражалось у зниженні швидкості споживання кисню, спряженні процесів дихання із фосфорилуванням і ефективності фосфорилування. А зростання споживання кисню при ФАД-залежному окисненні свідчить про розвиток мітохондріальної дисфункції [23].

Достовірне падіння швидкості споживання кисню в другому і третьому метаболічних станах при окисненні як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів, свідчить про «метаболічний стрес» у Мх міокарда при такому гіпоксичному впливі. Більш того, на ультраструктурному рівні така особливість енергетичного забезпечення міокарду супроводжувалася зростанням загальної площі мембран Мх в обох мітохондріальних субпопуляціях на фоні падіння рівнів експресії мРНК NRF-1 в 3,5 рази, зменшенням загальної кількості Мх та зростання гетерогенності Мх (особливо серед ІМФ фракції). Динамічні зміни при цьому зсувалися у бік процесів злиття, що спричинило

зростання розмірів Мх та появу Мх «некласичної» форми. Таким чином, ГГ застосована на тлі ПГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  не виявила до виражених адаптивних перебудов енергетичного обміну у тренованих тварин, спрямованих на підвищення резистентності дихального ланцюга Мх міокарду до дії ГГ при окисненні як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів.

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Взаємодія організму із навколишнім середовищем є невід'ємною умовою життя. Одним із механізмів взаємозв'язку з оточуючим середовищем є гіпоксія, що супроводжує як фізіологічні, так і патологічні процеси в організмі. Розвиток гіпоксичного стану супроводжується каскадом адаптивних (чи дезадаптивних) змін від органного до молекулярного рівнів організації живої матерії [1], що відображаються на функціонуванні систем постачання кисню, ефективності його споживання та утилізації в клітинних реакціях та, як наслідок, на резистентності як до самої гіпоксії так і до інших стресорних впливів [18]. Отриманий «адаптивний резерв», в подальшому, можна використовувати для попередження та корекції гіпоксичних станів різного генезу. Прикладом такого використання саногенного ефекту гіпоксії [3, 162] є гіпоксичні тренування, які широко застосовують сьогодні як нефармакологічний засіб профілактики і корекції як гіпоксичних станів [26], так і як засіб підвищення загальної резистентності організму.

Однак, будь-який з гіпоксичних режимів, поряд із корегуючою дією, вносить деструктивну компоненту, ступінь якої прямо залежить від процентного вмісту кисню у гіпоксичній суміші газів, тривалості епізодів гіпоксія/нормоксія [152] і є органоспецифічним [31]. Саме тому, вивчення патогенетичних шляхів розвитку деструктивних змін при гіпоксичних тренуваннях дасть змогу в майбутньому оптимізувати конструктивний ефект гіпоксичних тренувань.

Важливу роль у складній архітектурі адаптації до гіпоксії відіграють Мх - найбільш чутливі до неї органи [117, 122]. Мх є унікальними органами еукаріот, оскільки окрім енергетичної функції, вони відіграють важливу роль у кальцієвому гомеостазі, синтезі стероїдів, генерації АФК та ініціації апоптичної клітинної смерті [169]. Завдяки унікальній будові мембран, наявності власного геному, здатністю до руху (процеси fission-

fusion) і морфогенезу, - Мх грають домінуючу роль у клітинному метаболізмі, регуляції ряду фізіологічних функцій (скорочення міокарду; скорочення гладеньких м'язів травного тракту, судин і легень; підтримці іонних градієнтів у збудливих тканинах; акумуляція декретованого матеріалу у везикулах і підтримці гормональної і нейротрансміттерної функції) [117].

Мітохондріальна дисфункція при гіпоксії призводить до акумуляції в цитоплазмі клітин інтермедіатів метаболізму ліпідів і вуглеводів, накопичення іонів кальцію, вивільнення з мітохондрій цитохрому с та розвитку апоптозу [42, 51, 54, 93, 122]. За умов гіпоксії дихальний ланцюг мітохондрій є головним внутрішньоклітинним джерелом генерації АФК, надмірне утворення яких порушує, структуру мембран Мх та білків електронно-транспортного ланцюга, мітохондріальний геном та, як наслідок, метаболічні процеси в клітині [39, 66, 83, 94, 132].

Підтримка функціонування Мх залежить від правильної збірки білків на етапі морфогенезу, механізмів репарації функціонуючих Мх, їх динаміки та вчасної утилізації дисфункціональних [106, 109, 134, 135]. Порушення на будь-якому етапі роботи мітохондріального конвеєру умовно поділяють на два типи: первинна і вторинна дисфункція. До первинної дисфункції Мх відносять мутації мітохондріальних білків, що кодуються мтДНК чи закодовані у ядрі. До вторинної дисфункції Мх відносять ті, що спричинені патологічними процесами, які беруть свій початок поза Мх. Наприклад, пошкодження, які формуються під час ішемії/реперфузії і призводять до пошкодження Мх та послідуєчого порушення тканинного метаболізму. Інші причини порушення нормального функціонування Мх, що відносять до вторинної дисфункції це - сепсис, нейродегенеративні зміни, метаболічний синдром, рак, аутоімунні захворювання та діабет тощо. Захворювання, що зумовлені первинною дисфункцією Мх, зустрічаються із частотою 1 на 5000, на противагу вторинним, які супроводжують сучасне розвинене суспільство [128].

Таким чином, порушення роботи мітохондріального конвеєру, структурної цілісності, динаміки і функціонування Мх призводять до розвитку ряду патологічних процесів і потребують адекватної корекції - як фармакологічної, так і нефармакологічної природи.

В даній роботі була зроблена спроба дослідити можливості, які виникають, коли Мх розглядаються як мішень корегуючої дії ІГТ. Проведене нами комплексне дослідження морфо-функціональних змін у Мх легень і міокарду дозволяє наблизитися до розуміння механізмів, що лежать в основі формування адаптивної чи дезадаптивної відповіді Мх на різні режими ІГТ, і переконатися у тому, що вони носять органоспецифічний характер.

В результаті проведених досліджень нами було показано, що сеанси ІГТ змінювали структурно-динамічні та функціональні параметри Мх легень і міокарду. Обидва застосовані режими ІГТ окрім адаптивних перебудов супроводжувалися деструктивними змінами у Мх, ступінь яких залежав від жорсткості гіпоксичної компоненти і носив виражений органоспецифічний характер. Особливої уваги заслуговують дані, отримані під час дослідження рівнів експресії мРНК NRF-1- одного із ключових маркерів біогенезу Мх, який відповідає за експресію білків дихального ланцюга [136]. Розглянемо більш детально зміни.

Нами було показано, що одним із адаптивних механізмів, що формується у ході ІГТ, є активація біогенезу Мх, що виражалася у збільшенні загальної кількості Мх, появі юних органел та зростанні Sitot . Режим із помірною гіпоксичною складовою (із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>) викликав більш виражену ініціацію морфогенезу у обох досліджуваних тканинах, порівняно із ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>.

Біогенез Мх активується різноманітними чинниками під час клітинного стресу чи сигналів від навколишнього середовища [139, 154, 155] і є своєрідним протективним чинником. Ключовими регуляторами біогенезу Мх –маркерами біогенезу- прийнято вважати: PGC -1 $\alpha$ , NRF-1, NRF-2 та tfam

PGC-1 $\alpha$  є транскрипційним коактиватором, який активує NRF-2 та разом із ним NRF-1. 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. Застосування ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> викликало помірне зростання рівнів експресії мРНК NRF-1, яке не сягало 20%, тоді як застосування ІГТ із 7 % O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> у легенях ініціювало десятикратне підвищення рівнів експресії мРНК NRF-1, а в міокарді -лише в 1,7 рази. Подібна динаміка спостерігалася і після впливу ГГ - 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% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> також викликала більш виражене зростання рівнів експресії мРНК NRF-1 у легенях - в 5,3 рази, порівняно з міокардом - в 1,8 рази. ГГ, застосована на тлі проведеного ІГТ із 7 % O<sub>2</sub> викликала зниження в 2 рази та підвищення на 30% рівнів експресії досліджуваного гену. 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 ступінем вакуолізації. У таких Мх спостерігалася 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 у органелі [170, 183]). 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.

Наприкінці 1990 р. було показано, що збільшення рівнів експресії мРНК мітохондріальних білків відбувається внаслідок оксидативного стресу. [132].]. Інші дослідники [111] показали, що додавання до культури ембріонів мишей перекису водню ініціювало підвищення рівня мРНК PGC-1 $\alpha$  та PGC-1 $\beta$ , які в свою чергу регулюють рівні експресії NRF-1 та генів, що кодують каталазу та супероксиддисмутази. Також вже відомо, що експресія PGC-1 $\alpha$  є важливою для попередження пошкоджень від оксидативного стресу і апоптичної клітинної смерті [140]. Таким чином, наші результати разом із дослідженнями інших авторів вказують на наявність тісного взаємозв'язку між біогенезом Мх і рівнями АФК [96, 139, 160.].

Однією із важливих тем в галузі мітохондріальної фізіології є дослідження їх динаміки і молекулярних механізмів, які регулюють злиття (fusion) та роз'єднання (fission) Мх, оскільки їх направленість та баланс відображає функціональний стан клітини [134, 138]. Так, наприклад, нефункціонуючі Мх можуть втрачати здатність до злиття чи активувати роз'єднання Мх, тим самим запобігаючи поверненню функціонально неспроможних органел до мітохондріальної сітки. Більш того, процеси fusion і fission можуть забезпечувати збереження повноцінних Мх шляхом fusion і відсіювати неякісні Мх шляхом fission із наступною елімінацією останніх через мітофагію [129]. Коли пошкодження Мх носять помірний характер, запускається тригерний механізм інактивації Opa1, що призводить до послаблення злиття внутрішніх мембран Мх, не змінюючи злиття зовнішніх мембран Мх (що активуються Mfn1 і Mfn2). При виражених пошкодженнях Мх активуються Pink1–Parkin-керовані процеси, що призводять до протеасомної деградації Mfn1 і Mfn2 з наступною мітофагією [109]. Таким чином, за допомогою процесів злиття і роз'єднання Мх здатні контролювати «якість» своєї популяції і тим самим забезпечувати необхідне



енергозабезпечення під час росту і поділу клітини, а також сприяти адаптації до пошкоджуючих чинників.

Відомо, що Мх, які локалізовані у різних частинах клітини можуть мати різну морфологію, знаходитися у різних функціональних станах, по-різному взаємодіяти із іншими внутрішньоклітинними органелами та мати різну чутливість до оксидативного стресу і гіпоксії [58, 61, 69, 110]. Отримані в ході наших досліджень результати мають наукову новизну, оскільки дані стосовно впливу інтервальної гіпоксії на динаміку Мх в літературі поки що не висвітлювалися.

Якщо в контролі Мх респіраторного відділу легень розміщуються або навколо ядер або в потовщених ділянках цитоплазматичних відростків [10, 52], то після застосування ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  вони зосереджувалися нерівномірно в альвеолоцитах обох типів і, як правило, гуртувалися разом. У міокарді Мх (частіше в ІМФ фракції) мали ознаки процесів дроблення-злиття, що свідчить про активні динамічні зміни у мітохондріальному апараті під час ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ . Процеси злиття Мх переважали у місцях пошкодження міофібрил, що вказує на можливість міжмітохондріального обміну для оптимізації роботи пошкоджених гіпоксією Мх. ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною складовою також викликало зміну динаміки Мх, однак, якщо в легенях Мх гуртувалися разом в навколоядерній зоні, то в міокарді СС Мх мігрували у «ворсинки сарколеми», то ІМФ Мх гуртувалися в місцях лізису міофібрил та біля ядра. Формування з боку сарколеми ворсинкоподібних утворень, що містили в собі СС Мх, було більш характерним для ІГТ із 7 %  $O_2$  в  $N_2$ . Цей процес можна розглядати як адаптивний, що направлений на зменшення шляху дифузії кисню до Мх при таких гіпоксичних умовах. Однак, такі «ворсинки сарколеми» в одних кардіоміоцитах були «розтягнені» ендотеліальним набряком гемато-паренхіматозного бар'єру і містили СС фракцію Мх, що мала 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.

Згідно з отриманими даними, при гострій гіпоксії у легенях активувалися структурно-динамічні зміни, зростала кількість аутофагосом, що вказує на активацію процесів мітофагії та свідчить про наявність великою кількості пошкоджених органел, яких необхідно елімінувати. Більш того, такий процес може вказувати на ініціацію клітинної загибелі апоптозним шляхом [72, 74, 147]. Варто зазначити, що наявність процесів роз'єднання Мх носила мозаїчний характер, і на електронограмах зустрічалися альвеолоцити із меншою ступінню пошкоджень Мх. В таких альвеолоцитах Мх навпаки об'єднувалися і аутофагосом було значно менше. У міокарді розміщувалися СС Мх переважно поодинокі, вони заходили у «ворсинки сарколеми», тоді як ІМФ Мх, особливо з вираженими ознаками просвітлення матриксу та частковою дископлексацією крист навпаки - зливалися, тим самим забезпечуючи міжмітохондріальний обмін та репарацію пошкоджених органел.

ГГ застосована на тлі ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  у легенях викликала перевагу процесів злиття, однак велика кількість аутофагосом (яку ми спостерігали після дії ГГ у інтактних тварин) не утворювалася. Ці дані вказують на те, що впродовж такого режиму ІГТ напручуються механізми захисту мітохондріального апарату легень, які на рівні змін динаміки цих органел можуть знижувати деструктивний вплив гіпоксичного навантаження і не ініціювати мітофагію. Тестування ГГ якості режиму із більш жорсткою гіпоксичною компонентою навпаки, ініціювало процеси дроблення, що може вказувати на ініціацію апоптичних змін [164], оскільки супроводжувалося суттєвими деструктивними змінами як у мітохондріях, так і у легенях в

цілому. У міокарді тестуючи дія ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> призвела до появи дрібних поодинокі розміщених Мх у ділянках непошкоджених міофібрил, тоді як у місцях їх лізису спостерігали перевагу процесів злиття. ІГТ, застосоване на тлі ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> викликало перевагу процесів злиття Мх та міграцію їх до перинуклеарної зони. Отримані дані вказують на те, що динамічні властивості мітохондріального апарату грають важливу роль у напрацюванні адаптивних змін до ІГТ і мають виражений органоспецифічний характер. У легенях цей механізм є менш стійким до більш жорстокого гіпоксичного навантаження, порівняно із міокардом.

Виявлене в ході наших досліджень підвищення гетерогенності мітохондріальної популяції грає важливу роль в адаптації до досліджуваних режимів ІГТ. Так, під час ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> гетерогенність мітохондріальної популяції зросла як за рахунок конструктивних змін у структурі Мх (зміна форми крист, поява юних Мх, зростання кількості крист), так і внаслідок деструктивних змін (просвітлення і розрідження матриксу, поява вакуолізованих органел, із різним ступенем лізису крист). В літературі [168], зростання гетерогенності Мх пов'язують із змінами метаболічного стану клітини, зокрема із порушенням кальцієвої сигналізації та зростанням АФК [166]. Серед Мх легень поряд із неушкодженими і юними Мх зустрічалися органели із просвітленим матриксом, частково чи повністю вакулізованою внутрішньою мембраною. Як і у легенях, у кардіоміocyтах зустрічалися Мх із різним ступенем пошкодження та лізису крист. Особливо часто такі органели зустрічалися в місцях пошкодження міофібрил. Такі зміни свідчать про наявність вираженого гіпоксичного навантаження при ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>. Поодинокі у міокарді спостерігали появу мієлінізованих Мх, що вказує на зниження процесів окисного фосфорилування, зменшення утворення АТФ у цих ділянках кардіоміocyту [45] та на розвиток дисфункції Мх. ІГТ із 7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub> призвело до вираженого зростання гетерогенності мітохондріальної популяції, порівняно із ІГТ із 12% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>, в обох досліджуваних тканинах.

Після застосування ІГТ із більш жорсткою гіпоксичною компонентою зростання гетерогенності мітохондріальної популяції обумовлювалося активацією роботи мітохондріального конвеєру, направленої на репарацію пошкоджених Мх, вираженими деструктивними змінами та збільшенням загальної кількості структурно-змінених Мх. Дія ГГ, застосована на тлі ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$ , у легенях підвищувала відсоток вакуолізованих органел, тоді як у міокарді відсоток вакуолізованих органел був значно нижчим ніж у легенях, однак подекуди з'являлися Мх з вираженими ознаками мієлінізації, що свідчить про розвиток дисфункції Мх. Тестуюча дія ГГ більш жорсткого режиму ІГТ виявила підвищення гетерогенності Мх легень за рахунок збільшення відсотка вакуолізованих органел та появи дрібних Мх із затемненим матриксом, що може вказувати на ініціацію апоптичних змін [49]. У міокарді тестуючий вплив ГГ на тлі ІГТ із 7%  $O_2$  в  $N_2$  викликав виражену активацію гетерогенності Мх, що виражалася у появі Мх різних форм, частина яких характеризувалася зниженням їх функціональності. Підсумовуючи наведені дані, можемо констатувати той факт, що у легенях і міокарді однакове гіпоксичне навантаження викликало появу різних змін у Мх, що свідчить про виражену органоспецифічність.

Нами було показано, що ІГТ із 12%  $O_2$  в  $N_2$  викликає перебудову енергетичного обміну 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 оксидази, що запобігає інактивації ферментів дихального ланцюга при гіпоксії [23]. Так, у легенях це відбувається за рахунок підвищення фосфорильовального дихання, спряження дихання із фосфорилуванням та ефективності фосфорилування. Більш жорсткий режим ІГТ не покращував регуляцію енергетичних процесів у Мх в обох досліджуваних тканин. За умов гострої гіпоксії збільшувався внесок сукцинатоксидазного шляху, порівняно із НАД-оксидазним у загальний потік

електронів дихального ланцюга, оскільки периший менш чутливий до дефіциту кисню [105, 117]. 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 сукцинатоксидазного шляху окиснення, а адаптивні механізми енергетичного забезпечення полягали у збільшенні швидкості фосфорилувального дихання, спряженості 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 відмічалися переваги сукцинатоксидазного шляху окиснення.

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, викликає 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 дозволяли суттєво знижувати ступінь 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.

## 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% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>) 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 фосфорилювання та спряженості дихання з фосфорилюванням при окисненні НАД-залежних субстратів.
3. Дія ІГТ з більш жорсткою гіпоксичною складовою (7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>) 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%  $O_2$  в  $N_2$ ) 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%  $O_2$  в  $N_2$  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 ГГ, менш виражені в міокарді і легенях на тлі попередньо проведеного ІГТ 12%  $O_2$  в  $N_2$ . 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%

O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>); 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 ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Агаджанян Н.А. Классификации гипоксических, гипо- и гиперкапнических состояний / Н.А. Агаджанян, А.Я.Чижов // Фізіологічний журнал. – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 11-16.
2. Архипенко Ю.В. Механизмы повышения резистентности функциональных систем организма в процессе адаптации к изменению уровня кислорода / Ю.В. Архипенко, Т.Г. Сазонтова. Сб. трудов «Гипоксия. Автоматизированный анализ гипоксических состояний». - Москва-Нальчик: Б.и. - 2005. – С. 30-36.
3. Березовский В.А. Два типа гипоксии / В.А. Березовский // Гіпоксія: конструктивна і деструктивна дія.- Київ-Терскол: Наук. думка. – 1998. - С. 33-34.
4. Березовский В.А. Физиологические предпосылки и механизмы нормализующего действия нормобарической гипоксии и оротерапии / В.А. Березовский, М. И.Левашов // Физиол. журн. - 1992. - Т. 38, № 5. - С. 14-19.
5. Бойков А.К. Ультраструктура альвеол млекопитающих / А.К. Бойков // Легкое в норме [под ред. И.К.Есиповой]. – Новосибирск: Наука, 1975. – С. 60-73.
6. Вейбель Э.Р. Морфометрия легких человека / Э.Р.Вейбель [пер. с англ.]. – М.: Медицина, 1970 – 170 с.
7. Влияние активатора АТР-зависимого K<sup>+</sup>-канала на трансмембранный обмен калия и образование активных форм кислорода в условиях открывания митохондриальной поры / О. В. Аكوпова, Л. И. Колчинская, В. И. Носарь [и др.]. - Ukr. Biochem. J. – 2014. - V. 86, N 2. – P. 26 - 40.
8. Гипоксия. Адаптация. Патогенез. Клиника [под ред. Ю.Л. Шевченко] – СПб.: ЭЛБИ-СПБ. – 2000. - 383 с.
9. Гончар О.А. Влияние разных режимов интервальных гипоксических тренировок на морфологические характеристики и антиоксидантный статус

ткани сердца и легких / О.А. Гончар, Е.В. Розова // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2007. – Т. 144, N 8. – С. 216-220.

10. Ерохин В.В. Клеточная биология легких в норме и при патологии [под ред. П.К. Романовой]. – М.: Медицина, 2000. – 496 с.

11. Есипова И.К. Легкое в норме / И.К. Есипова. - Т.1. – Новосибирск: Наука, 1975. – 285 с.

12. Жулінський В.О. Використання інтервальних гіпоксичних тренувань в комплексному лікуванні хворих на цукровий діабет і гіпертонічну хворобу / Жулінський В.О., Каджарян В.Г., Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Курінна І.В. // Мат. XIV з'їзду терапевтів України. – К., 1998. – С. 541–543.

13. Іванченко М.В. Ультраструктурна характеристика мітохондрій кардіоміоцитів у ранньому кардіогенезі щурів / М.В.Іванченко, І.В.Твердохліб // Морфологія. – 2012. – Т. VI , №3. – С. 19-25.

14. Іванченко М.В. Формування мітохондріального апарата скоротливих кардіоміоцитів в нормі та за умов гіпоксичного ушкодження кардіогенезу / М.В. Іванченко, І.В. Твердохліб // Морфологія. – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 5-20.

15. Караш Ю.М. Нормобарическая гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации / Ю.М. Караш, Р.Б. Стрелков.- М.: Медицина, 1998. – 326 с.

16. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. – К.: Вища школа, 1984. – 204 с.

17. Коваленко Е.А. Полярнографическое определение кислорода в организме / Е.А. Коваленко, В.А. Березовский, И.М. Эпштейн – М.: Медицина. – 1975. - 77 с.

18. Колчинская А. З. Интервальная гипоксическая тренировка в спорте высших достижений / А. З. Колчинская //. Спортивна медицина. – 2008. – № 1. – С. 9-25.

19. Колчинская А.З. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте / А.З. Колчинская, Т.Н. Цыганова, Л.А. Остапенко. – М.: Медицина, 2003.– 408 с.

20. Костюк П.Г. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація. Структури та функції / П.Г.Костюк, О.П.Костюк, О.О.Лук'янець - К.: Наукова думка, 2010. - 175 с.
21. Ленинджер А. Митохондрия. Молекулярные основы структуры и функции / А. Ленинджер [пер. с англ.]. - М.: Мир, 1966. - 316 с.
22. Лир В. Аноксия и влияние ее на организм / В. Лир [пер. с англ.]. - М.: Медгиз, 1947. - 252 с.
23. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 2011. - № 1. – С. 3–19.
24. Малкин В.Б. Острая и хроническая гипоксия / В.Б.Малкин, Е.Б. Гиппенрейтер. - М.: Наука. – 1977. – 319 с.
25. Манухина Е.Б. Генетические особенности продукции и депонирования оксида азота при адаптации к гипоксии / Е.Б. Манухина, Б.В. Смирин // Нур. Med. J. – 2001. – V. 9, № 4. – Р. 35-41.
26. Маньковська І.М. Мітохондрії як мішень інтервальної гіпоксії / І.М.Маньковська, Т.В.Серебровська //Фізіологічний журнал. – 2014. – Т. 60, № 6. – С. 75-84.
27. Меерсон Ф.З. Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике / Ф.З. Меерсон. – М.: Наука, 1989. – 70 с.
28. Минченко А. Г. Митохондриальный геном / А.Г. Минченко, Н.А. Дударева. – Новосибирск: Наука, 1990. – 194 с.
29. Пауков В.С. Адаптация сердца к гипоксии / В.С. Пауков, Н.К. Хитров. – М.: Медицина, 1991. – 237 с.
30. Розова К.В. Взаємозв'язок тканинного дихання та деяких стереометричних характеристик мітохондрій у тканині легень при різних модифікаціях гіпоксичної гіпоксії / К.В. Розова, А.І. Назаренко, Т.І. Таволжанова // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 6. – С. 25-29.
31. Розова К.В. Деякі механізми морфофункціональних змін в тканині

- легень при гіпоксичних впливах різного генезу / К.В. Розова, Т.В. Болгова, І.М. Маньковська // Вісник наук. досліджень. – 2009. – № 3 – С. 13-18.
32. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом [под ред. Г. М. Франка]. – М.: Наука, 1973. – 78с.
33. Рямова К. А. Особенности дыхания митохондрий при гипоксии и ацидозе / К.А. Рямова, А.С. Розенфельд // Человек. Спорт. Медицина. – 2008. – Т. 199, № 19. – С. 31-35.
34. Саакян И. Р. Активация и ингибирование сукцинатзависимого транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии печени при развитии адаптационных реакций / И. Р. Саакян, С. Г. Саакян, М. Н. Кондрашова // Биохимия. – 2001. – Т. 66, №. 7. – С. 976–984.
35. Сапрунова В. Б. Ультраструктура митохондриального аппарата кардиомиоцитов при апоптозе, индуцированном продолжительной аноксией у крыс / В. Б. Сапрунова, Л. Е. Бакеева, Л. С. Ягужинский // Цитология. – 2003. – Т. 45, № 11. – Р. 1073-1082.
36. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран / В.П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. – 564с
37. Солодовникова И. М. Морфофункциональные характеристики митохондрий кардиомиоцитов изолированных кусочков миокарда при инкубации в условиях гипоксии : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.25-03 / И.М. Солодовникова. – М., 2007. – 22 с.
38. Солодовникова И.М. Динамика изменений ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов изолированного миокарда крысы при длительной инкубации в условиях аноксии / И.М.Солодовникова, В. Б. Сапрунова, Л. Е. Бакеева, Л. С. Ягужинский // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 10. – С. 848-855.
39. Стешенко М.М Оксидативні порушення мітохондрій при гіпоксії та їх корекція за допомогою інтервальних гіпоксично- гіпероксичних тренувань /

М.М. Стешенко, О.О. Гончар, І.М. Маньковська // Эксперим. та клінічна фізіол. і біохім. – 2010 - № 1. - С. 12-17.

40. Стешенко М.М. Зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу і функціонального стану мітохондрій міокарду щурів при гострій гіпоксії та засоби їх попередження : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. біол. наук : спец. 03.00.13 / М. М. Стешенко. - К., 2012. - 24 с.

41. Стрелков Р.Б. Прерывистая нормобарическая гипоксия профилактике, лечении и реабилитации / Р.Б. Стрелков, А.Я. Чижов. - Екатеринбург: Уральский рабочий, 2001. – 400 с.

42. Судаков Н.П. Роль митохондрий в реализации запрограммированной гибели клетки / Н.П.Судаков, С.Б.Никифоров, Ю.М.Константинов, С.А.Лепехова // Бюллетень ВСНЦСО РАМН. – 2007. – Т. 53, №1. – С. 103-107.

43. Ташке Э. Введение в количественную цитогистологическую морфологию [пер. с рум.] / Э. Ташке. – Бухарест: Изд-во АСРР, 1980. – 192 с.

44. Улумбеков Э.Г. Гистология. Введение в патологию / Э.Г. Улумбеков, Ю.А. Чельшева. – М.: ГЕОТАР Медицина, 1998. – 960 с.

45. Фрагментация матрикса митохондрий как защитный механизм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Д.А. Кнорре, С.М. Ожован, В.Б. Сапрунова, С.С. Соколов, Л.Е. Бакеева, Ф.Ф. Северин// Биохимия. - 2008.- Т.43 № 11- С. 1561-1568.

46. Цыганова Т.Н. Эффективность использования адаптации к гипоксии в курсе интервальной нормобарической гипоксической тренировки в медицине / Т.Н. Цыганова. – М.: НИИПРУ КБНЦ РАН, 2000. – 186 с.

47. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию / Ю. С. Ченцов. – М.: Академкнига, 2004. – С. 324-355.

48. Чижов А.Я. Прерывистая нормобарическая гипокситерапия в лечении артериальной гипертензии / А.Я. Чижов, Е.М. Жеребкер // Клин. геронтол. - 2008. - № 3. - С. 44-47.

49. Шабдаш А.Л. Морфологическая (электронномикроскопическая и гистохимическая) организация митохондрий в различные фазы клеточных функций / А.Л.Шабдаш // Митохондрии. Структура и функции. - М.: Наука, 1966. - С. 5-22.
50. Шатило В. Б. Безпечність та ефективність застосування інтервальних нормобаричних гіпоксичних тренувань у людей похилого віку / В. Б.Шатило, О. В Коркушко., В. О Іщук та ін // Український пульмонологічний журнал. – 2005. – № 3 (додаток). – С. 88-92.
51. Шахламов В.А. Реакция клеток на гипоксию / В.А. Шахламов, В.И. Сороковой // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1983. – № 7. – С. 12-25.
52. Электронная микроскопия органов и тканей / К. А. Зуфаров, П. И. Ташходжаев, Е. К. Шишова, Д. Х. Хамидов. - Ташкент: Медицина УзССР, 1971. - 322 с.
53. Электронномикроскопический анализ кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс в условиях моделирования эффектов невесомости и искусственной силы тяжести / Е. Н. Вареник, Т. В. Липина, М. В. Шорникова [и др.] // Известия Рос. Акад. наук. Серия биологическая. – 2012. – № 3. – С. 270.
54. Active defense under oxidative stress. The antioxidant responsive element / V.V. Lyakhovich, V.A. Vavilin, N.K. Zenkov [et al.] // Biochemistry. - 2006. - V. 71, № 9. - P. 962-974.
55. Arkhipenko Yu.V. Adaptation to periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver, and brain / Yu.V. Arkhipenko, T.G. Sazontova, A.G. Zhukova // Bull. Exp. Biol. Med. – 2005. – V. 140, № 3. – P. 278-281.
56. Bartz RR. Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection morphology / RR Bartz, H.B. Suliman, C.A. // Front Physiol. – 2015. – V. 26, № 6.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4620408/pdf/fphys-06-00291.pdf> (дата звернення: 12.03.2016).

57. Biogenesis and Signaling by Mitochondrial Dynamics / W. Li, T. Sun, B. Liu [et al.] // Sci Rep. – 2016. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5020656/pdf/srep32933.pdf> (дата звернення 2.02.2016).

58. Birben E. Oxidative Stress and Antioxidant Defense / E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen // World Allergy Organ J. – 2012. – V. 5, № 1. – P. 9–19.

59. Blik A. M. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion / A. M. Blik, Q. Shen, S. Kawajiri // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – V.76, № 5. a011072. URL <http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/6/a011072.full.pdf+html> (дата звернення: 26.12.2015).

60. Borutaite V. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria and the reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide / V. Borutaite, G.C. Brown // Biochem. J. - 1996 - V.315. - P. 295 - 299.

61. Cadenas E. Mitochondrial free radical production, antioxidant defenses and cell signaling / E. Cadenas, A. Boveris // The Handbook of Environmental Chemistry. - Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. – V.2. – P. 219 – 234.

62. Chan D.C. Mitochondrial fusion and fission in mammals / Annu. Rev. Cell Dev. Biol.– 2006. – V. 22, № 10. – P. 79 - 99.

63. Chance B.W. The respiratory chain and oxidative phosphorylation / B.W. Chance, V.R. Williams // Adv. Enzymol. - 1956 - V.17, № 1. - P. 65 - 132.

64. Chang. Mitochondrial trafficking in healthy and injured neurons / P.Mishra, D. C. Chan // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2014. – V.15, № 10. – P.634 – 646.

65. Chen H. Mitochondrial dynamics – fusion, fission, movement and mitophagy–in neurodegenerative diseases / H. Chen, C. David // Human Mol. Gen. – 2009. –V. 18, Issue 2. – P. 169 – 176.

66. Circu M.L. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis / M.L. Circu, T.Y. Aw // Free Radic Biol Med . – 2010. – V. 48, № 6. – P. 749 -762.

67. Cogliati S. Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency / S.Cogliati, C. Frezza, M.E Soriano, et al // Cell. – 2013. – V. 155, № 1. – P. 160 - 171.
68. Control of mitochondrial gene expression in the aging rat myocardium / C.M.R. LeMoine, G.B. McClelland, C.N. Lyons [et al.] // Biochem. Cell Biol. – 2006. – V. 84, № 4. – P. 191 – 198.
69. Cortassa S. Redox-Optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS / S. Cortassa, B. O'Rourke // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1837, № 2. – P. 287–295.
70. Cowdry E.V. Historical background of research on mitochondria / E.V. Cowdry // J. Histochem. Cytochem. – 1953. – V.13, № 1. – P. 71-83.
71. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy / V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis // Biochimica Biophysica Acta (BBA) et Mol. Cell Res. – 2013. – V. 1833, № 12. – P. 3448–3459.
72. Detmer S.A. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics / S.A. Detmer, D.C. Chan // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2007 - V.8, № 11. - P. 870 - 879.
73. Dominy J.E. Mitochondrial Biogenesis through Activation of Nuclear Signaling Proteins / J.E. Dominy, P. Puigserver // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – № 5. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3685894/pdf/cshperspect-MIT-a015008.pdf>. (дата звернення: 11.11.2015)
74. Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling / O. Hidenori, N. Miyata, O. Kuge, K. Mihara // JCB. - 2016. - V. 212, № 5. – P.531-544.
75. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease / L. Hoppel, B. Tandler, H. Fujioka, A. Rivad // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2009. – V. 41, № 10. – P. 1949–1956.



76. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane / F. Vogel, C. Bornhövd, W. Neupert, A.S. Reichert // J. Cell Biol. – 2006. – V. 175, № 2. – P. 237–247.
77. Effects of local pH on the formation and regulation of cristae morphologies / D.H. Song, J. Park, M.A. Philbert [at all.] // Phys. Rev. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. – 2014. – V. 90, № 2-1. - 022702.
78. Evans M. J. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter / M.J. Evans, R.C. Scarpulla // J. Biol. Chem. – 1989. - V. 264, № 24. – P. 14361–14368.
79. Evans M. J. NRF-1: a trans-activator mitochondrial design of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells / M.J. Evans, R.C. Scarpulla // Genes Dev. – 1990. – V. 4, № 6. – P. 1023–1034.
80. Expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  in the lungs and metabolic changes during intermittent hypoxia in rats of different ages / V.I. Portnichenko, A.G. Portnychenko, V.E. Dosenko, A.M. Sidorenko // Achievements Clin. Exper. Med. – 2010. - № 2. – P. 3-8.
81. Faiss R. Advancing hypoxic training in team sports: from intermittent hypoxic training to repeated sprint training in hypoxia / O Girard , G.P.Millet // Br J Sports Med. – 2013. Suppl 1. – P. 45-50.
82. François R.J. Shulman Regulation of mitochondrial biogenesis / R.J. François, I. Gerald // J. Biochem. – 2010. – № 14. - P. 4769-4784.
83. Frank J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure / J. Frank // J. Clin. Invest. – 2005. - V. 115, № 3. – P. 500-508.
84. Fujishiro N. Mechanisms for hypoxia detection in O<sub>2</sub>-sensitive cells / N. Fujishiro, Y. Endo // Japanese J. Physiol. – 2004. –V. 54, № 6. – P. 109-123.
85. Gaesh K. Analysis of expression and posttranslational modification of proteins during hypoxia / K. Gaesh // J. Appl. Physiol. – 2005. – V. 96, № 10. – P. 1178 - 1186.
86. Giaccia A. J. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in

- development, normal function, and disease / A.J. Giaccia, M.C. Simon, R. Johnson // *Genes and Development*. – 20. – V.18, № 18. – P. 2183 - 2194.
87. Giovanni B. Role of mitochondrial network organization in the regulation of energy production in living human cells: a multi-approach study / B. Giovanni, P. Parrone, B. Faustin // *Mitochondrial Physiol. Network* – 2005. – V. 10, № 9. - P. 57 - 59.
88. Giovanni B. Ultrastructure of the Mitochondrion and Its Bearing on Function and Bioenergetics / B. Giovanni, R. Rossignol // *Antioxidants Redox Signaling*. – 2008. -V. 10, № 8. – P. 1313–1342.
89. Goda N Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism / N. Goda, M. Kanai // *Int. J. Hematol.* – 2012. – V. 95, № 3. – P. 457-463.
90. Gonchar O. Antioxidant system in adaptation to intermittent hypoxia / O. Gonchar, I. Mankovska // *J. Biol.Sci.* – 2010. – V.10, № 6. – P. 545 - 554.
91. Hales K.G. Mitochondrial fusion and division / K.G. Hales // *Nature Education*. – 2010. – V.3, № 9. - P. 12.
92. Hodneland N. L. A new live-cell reporter strategy to simultaneously monitor mitochondrial biogenesis and morphology / Hodneland N. L.,Nitschke I.K., Nikolaisen J. [et al.] // *IUBMB Life*.– 2016. – V. 68, № 9. – P. 748– 755.
93. Hoppeler H. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia / H. Hoppeler, M. Vogt, R. Ewald // *Exp. Physiol.* – 2003. – V. 88, № 1. – P. 109–119.
94. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism / G. Solaini, A. Baracca, G. Lenaz, G. Sgarbi. – 2010. – V.18, Issues 6–7 . – P. 1171 - 1177.
95. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism / G. Solaini, A. Baracca, G. Lenaz, G. Sgarbi // *Biochim. Biophys. Acta: Bioenergetics*. – 2010. – V. 1797, Issues 6–7. – P. 1171–1177.
96. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence / H.C. Lee, P.H. Yin, C.W. Chi, [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – 2002. - V. 9, №. 5-6. – P. 517–526.
97. Intermittent hypoxia and neurorehabilitation / E.J Gonzalez-Rothi , K.Z.

- Lee, E.A Dale [et al.] // J Appl Physiol. -2015. - V.119, № 12. – P. 1455 - 1465.
98. Intermittent hypoxia conditioning prevents endothelial dysfunction and improves nitric oxide storage in spontaneously hypertensive rats / E.B. Manukhina, D. Jasti, A.F. Vanin, H.F. Downey // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2011. – V. 236, № 7. – P. 867- 873.
99. Intermittent hypoxia degrades HIF-2 via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities / J. Nanduri, N. Vang, G. Yuan [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – V. 106, № 4. – P. 1199-1204.
100. Intermittent Hypoxia in Treatment of Bronchial Asthma in Childhood / T.V. Serebrovskaya, K.V. Nesvitailova, A.N. Bakunovsky, I.N. Mankovska // Intermittent Hypoxia and Human Diseases. – London: Springer, 2012. - Chapter 11. – P. 235-246.
101. Intermittent Hypoxia: Cause of or Therapy for Systemic Hypertension? / T.V. Serebrovskaya, E.V. Manukhina, M.L. Smith [et al.] // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2008. – V. 233, № 6. – P. 627-650.
102. Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications [ed by L. Xi, T.V. Serebrovskaya]. - NY: Nova Science Publishers, 2009. - 602 p.
103. Karbowski M. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis / M.Karbowski, R.J.Youle // Cell Death and Differentiation. – 2003. – № 10. – P. 870-880.
104. Kim I. Selective degradation of mitochondria by mitophagy / I. Kim, S. Rodriguez-Enriquez, J.J. Lemasters // Arch. Biochem. Biophys. – 2007. - V. 462, № 2. – P. 245–253.
105. Kondrashova M. N. The formation and utilization of succinate in mitochondria as a control mechanism of energization and energy state of tissue / M.N. Kondrashova // Biological and Biochemical Oscillators. - New York: Acad. Press, 1993. – P. 373–397.
106. Kotiadis V. N. Mitochondrial quality control and communications with the

nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health / V. N. Kotiadis, M. R. Duchon, L.D. Osellame // *Biochim Biophys Acta* . – 2014. - V. 1840, № 4. – P. 1254-1265.

107. Kumar H. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? / H. Kumar, D.K. Choi // *Mediators of Inflammation*. – 2015. – V. 2015. –11 P. <https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/584758/> (дата звернення: 17.01.2016).

108. Kuznetsov A.V. Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within cells as another level of mitochondrial complexity / A.V. Kuznetsov, R. Margreite // *Int. J. Mol. Sci.* - 2009 – V.10, № 1 - P. 1911 - 1929.

109. Langer T. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing / T. Langer, T. Takashi // *EMBO J.* - 2008 - V. 27, № 2. - P.306 - 314.

110. Lass A. Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation, and longevity in different mammalian species / A. Lass., S Agarwal., R. Sohal // *J. Biol. Chem.* - 1997 - Vol. 272. – P.19199-19204.

111. Liang H. PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism / H. Liang, W. F. Ward // *J. Biol. Chem.* – 2006. - V. 30, № 4 . – P. 145–151.

112. Liesa M. Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease . / M. Liesa, M. Palacín, A. Zorzano // *Physiological Reviews* – 2009. - V.89, № 3. - P.799 - 845.

113. Lim S.Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation / S.Lim, K.R. Smith, S.Lim, R.Tian, J.Lu, M.Tan // *Cell & Bioscience*. – 2016. – V. 6, № 25. URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4832502/pdf/13578\\_2016\\_Article\\_89.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4832502/pdf/13578_2016_Article_89.pdf) (дата звернення: 23.03.2016).

114. Lopata V.A. Hypoxicators: Review of the Operating Principles and

Constructions / V.A. Lopata, T.V. Serebrovskaya // Intermittent Hypoxia and Human Diseases. – London: Springer, 2012. - Chapter 24. – P. 291-302.

115. Los Mitoptosis, a Novel Mitochondrial Death Mechanism Leading Predominantly to Activation of Autophagy / J. R. Jangamreddy, J. Marek // Hepat. Mon. – 2012. – V. 12, № 8. URL: [http://hepatmon.com/?page=article&article\\_id=6159](http://hepatmon.com/?page=article&article_id=6159) (дата звернення 24.03.2016).

116. Lukyanova L.D Mitochondrial signaling in formation of body resistance to hypoxia / L.D. Lukyanova, A.V. Dudchenko, E.L. Germanova // Intermittent hypoxia: from molecular mechanism to clinical application. - New York: Nova Science Pub Inc., 2009. – P. 423-450.

117. Lukyanova L.D. Mitochondrial Signaling in Hypoxia / L.D. Lukyanova // Open J. Endocrine and Metabolic Dis. – 2013. - № 3. – P. 20-32.

118. Lukyanova L.D. Energetropic Effects of Intermittent Hypoxia: Role of Succinate-Dependent Signaling / L.D. Lukyanova, Yu. I. Kirova, E.L. Germanova // Intermittent Hypoxia and Human Diseases. - London: Springer, 2012. - Chapter 20. – P. 239-252.

119. Lukyanova L.D. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia /L.D. Lukyanova,Y.I. Kirova // Front Neurosci. – 2015. - № 9.–15 Режим доступу до електронного ресурсу: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4589588/pdf/fnins-09-00320.pdf> (дата звернення 20.03.2016).

120. M. Koppen. Protein Degradation within Mitochondria: Versatile Activities of AAA Proteases and Other Peptidases / M. Koppen., T. Langer // Critical Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2007. - V. 42, №3. – P. 221-242.

121. Mateika J.H. Experimental protocols and preparations to study respiratory long term facilitation / J.H. Mateika, K.S. Sandhu // Respir. Physiol. Neurobiol. – 2011. – V. 176, № 1-2. – P. 1–11.

122. Mato J. The biology of hypoxia: the role of oxygen in development, normal function, and disease / J. Mato, M. Giaccia // *Eur. Respir. J.* – 2004. – V. 200, № 11. – P. 1395-1405.
123. Megan M. C. Mitochondrial Dynamics and Apoptosis / M.C. Megan M. C., R.J. Youle // *Mitochondrial Dynamics and Neurodegeneration*, 2011. - Chapter 26. – P. 109-138.
124. MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization / A.K. Alkhaja, D.C. Jans, M. Nikolov, M. Vukotic // *Mol. Biol. Cell.* – 2012. – V. 23, № 2. – P. 247-57.
125. Mitochondria, Energetics, Epigenetics, and Cellular Responses to Stress / D.T. Shaughnessy, K. McAllister, L. Worth [at all.] // *Environ. Health Perspect.* – 2012. – V. 122, № 12. – P. 1271–1278.
126. Mitochondrial energy metabolism plays a critical role in the cardioprotection afforded by intermittent hypobaric hypoxia / Z.H. Wang, X.L. Cai, L. Wu [at all.] // *Exp. Physiol.* – 2012. – V. 97, № 10. – P. 1005-1018.
127. Mitochondrial Morphological Features Are Associated with Fission and Fusion Events / L.M. Westrate, J.A. Drocco, K.R. Martin [at all.] // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, № 4. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3986258/> (дата звернення 20.03.2016).
128. Mitochondrial pharmacology / R.A. Smith, R.C. Hartley, H.M. Cochemé, M.P. Murphy // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2012. – V. 33, № 6. – P. 341-352.
129. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner / M. Frank, S. Duvezin-Caubet, S. Koob [at al.] // *Mol. Cell Res.* – 2012. - V. 1823, Issue 12. - P. 2297–2310.
130. Mitoptosis: different pathways for mitochondrial execution / A. Tinari, T. Garofalo, M. Sorice [at all.] // *Autophagy.* – 2007. – V. 3, № 3. – P. 282-284.

131. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 / L. Galluzzi, I. Vitale, J.M. Abrams // *Cell Death Differ.* – 2012. – V. 19, № 1. – P. 107-120.
132. Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M. P. Michael // *Biochem. J.* – 2009. – V. 417, № 1. – P. 1–13.
133. Neubauer J.A. Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia / J.A. Neubauer // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – V. 90, № 4. – P. 1593-1599.
134. Ni H.M. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control / H.M. Ni, J.A. Williams, W.-X. Ding // *Redox Biol.* – 2015. – V. 4, № 1. – P. 6–13.
135. Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell / K.G. Lyamzaev, O.K. Nepryakhina, V.B. Saprunkova [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1777, № 7-8. – P. 817-825.
136. Nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) regulated hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) under hypoxia in HEK293T / Wang D., Zhang J., Lu Y., Luo Q. [et al.] // *IUBMB Life.* – 2016. – V. 68, № 9. – P. 748– 755.
137. O'Rourke B. From bioblasts to mitochondria: ever expanding roles of mitochondria in cell physiology / B. O'Rourke // *Front. Physiol.* – 2010. – V 1, № 7 – P. 7-11.
138. Osellame L.D. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function / L.D. Osellame, T.S. Blacker, M.R. Duchen // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2012. – V. 26, № 6. – P. 711-723.
139. Palikaras K. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis / K. Palikaras, E. Lionaki, N. Tavernarakis // *Cell Death Different.* – 2015. – V. 22, № 9. – P. 1399-1401.
140. PGC-1 $\alpha$  regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells / A. A.-B. Valle, E. Arza, S. Lamas, M. ' Monsalve // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – V. 66, № 3. – P. 562–573.

141. Phase changes in energy metabolism during periodic hypoxia / V.I. Portnichenko, V.I. Nosar, A.G. Portnichenko [at all.] // *Fiziol. Zh.* – 2012. – V. 58, № 4. – P. 3-12.
142. Porter G.A. Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation / G.A. Porter, J. R. Hom, D.L. Hoffman // *Progress in Pediatric Cardiol.* – 2011. - V. 31, Issue 2. – P. 75–81.
143. Prabhakar N.R. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2 / N.R. Prabhakar, G.L. Semenza // *Physiol. Rev.* – 2012. - V. 92, № 3. – P. 967–1003.
144. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.L. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. - V.193, № 1. - P. 265 - 275.
145. Rapaport D. Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer - membrane proteins // *EMBO Rep.* / D. Rapaport. – 2003. - V.4, № 10. - P. 948 - 952.
146. Reactive oxygen species and redox-signaling during adaptation to changes of oxygen / T.G. Sazontova, N.A. Anchishkina, A.G. Zhukova [at all.] // *Fiziol. Zh.* - 2008 - V. 54, № 2. - P. 18-32.
147. Recent advances into the understanding of mitochondrial fission / K. Elgass, J. Pakay, M. T. Ryan, C.S. Palmer // *Biochim Biophys Acta* . – 2013. - V. 1833, № 1. – P. 150–161.
148. Regulation of mitochondrial fusion and division / K.L. Cervený, Y. Tamura, Z. Zhang [at all.] // *Trends Cell Biol.* – 2007. – V.17, № 11. – P.563–569.
149. Respiration of rat lung mitochondria and the influence of calcium on substrate utilization / A.B. Fisher, A. Scarpa, K.F. LaNoue [at all.] // *Biochemistry.* – 1973. – № 12. - P.1438-1443.



150. Role of membrane contact sites in protein import into mitochondria / S.E. Horvath, H. Rampelt, S. Oeljeklaus [et al.] // *Protein Sci.* – 2015. – V. 24, № 3. – P. 277–297.
151. Rozova E.V. Structural and Dynamic Changes in Mitochondria of Rat Myocardium under Acute Hypoxic Hypoxia / E.V. Rozova, I.N. Mankovskaya, G.D. Mironova // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2015. – V. 8, № 8. – P. 994–1000.
152. Rozova K. Benefits and Risks of Different Regimen of Intermittent Hypoxic Training / K. Rozova, O. Gonchar, I. Mankovska // *Intermittent Hypoxia and Human Diseases*. – London: Springer, 2012. – Chapter 22. – P. 273–280.
153. Sazontova T.G. Intermittent hypoxia in resistance of cardiac membrane structures: role of reactive oxygen species and redox signaling / T.G. Sazontova, Yu.V. Arkhipenko // *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications*. – NY: Nova Science Publishers, 2009. – Chapter 5. – P. 113–150.
154. Scarpulla R.C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network / R.C. Scarpulla // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2011. – V. 1813, № 7. – P. 1269–1278
155. Scarpulla R.C. Nuclear Control of Respiratory Chain Expression by Nuclear Respiratory Factors and PGC-1-Related Coactivator / R.C. Scarpulla // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2008. – V. 45, № 3. – P. 321–334.
156. Scarpulla R.C. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis / R.C. Scarpulla, R.B. Vega, D.P. Kelly // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2012. – V. 23, № 9. – P. 459–466.
157. Scarpulla R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function / R.C. Scarpulla // *Physiol. Rev.* – 2008. – V. 88, Issue 2. – P. 611–638.
158. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis / M.C. Maiuri, E. Zalckvar, A. Kimchi, G. Kroemer // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* –

2007. - № 8. – P. 741–752.

159. Semenza G.L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Semenza // *Biochem. J.* – 2007. – V. 405, № 1. – P. 1–9.

160. Sena L. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species / L. Sena, N.S. Chandel // *Mol. Cell.* – 2012. – V. 48, № 2. – P. 158–167.

161. Serebrovskaya T.V. Intermittent hypoxia training as non-pharmacologic therapy for cardiovascular diseases / T.V Serebrovskaya, L. Xi. // *Practical analysis on methods and equipment. Exp Biol Med (Maywood).* . – 2016. - V. 241, № 15. – P. 1708–23.

162. Serebrovskaya T.V. Intermittent hypoxia in childhood: the harmful consequences versus potential benefits of therapeutic uses / T.V Serebrovskaya, L. Xi. // *Front Pediatr.* - 2015 - V. 19, №3.URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fped.2015.00044> (дата звернення: 12.03.2016).

163. Serebrovskaya T.V. Intermittent hypoxia research in the former soviet union and the commonwealth of independent States: history and review of the concept and selected applications / T.V. Serebrovskaya // *High Alt. Med. Biol.* – 2002. - V. 3, Issue 2. – P. 205-221.

164. Skulachev V.P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis / V.P. Skulachev // *Apoptosis.* – 2006. - V. 11, N 4. – P. 473–485.

165. Skulachev V.P. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: “it is better to die than to be wrong” / V.P. Skulachev // *IUBMB Life.*– 2000. - V. 49, № 5. – P. 365–373.

166. Stephen W. G. Mitochondria and cell signaling / W.G. Stephen, D.R. Tait // *J. Cell Sci.* – 2012. – V. 125, № 4. – P. 807–815.

167. Substrate-dependent modulation of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria following in vitro hypoxia and reoxygenation injury / D. Maruyama, N. Hirata , R. Miyashita, R. Kawaguchi [et al.].// *Exp Clin Cardiol.* – 2013. – V. 18, № 2. – P. 158–160.

168. Sugiura A. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles / A. Sugiura, G.L. McLelland, E.A. Fon, H.M. McBride // *EMBO J.* – 2014. - V. 33, № 19. – P. 2142-2156.
169. Tait S.W. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond / S.W. Tait, D.R. Green // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – V. 11, № 9. – P. 621-632.
170. The conformational basis of energy transformations in membrane systems. Conformational changes in mitochondria / D.E. Green, J.T. Penniston, R.A. Harris, J. Asai // *Biochemistry.* – 1968. - V.59, № 2. - P. 624 - 631.
171. The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy deficient *S. Cerevisiae* strains / Y. Zhang, H. Qi, R. Taylor [at all.] // *Autophagy.* – 2007. – № 3. – P.337–346.
172. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of fzo, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion / Y. Eura, N. Ishihara, S. Yokota, K. Mihara // *J. Biochem.* – 2003. -V.134, № 3. – P. 333-344.
173. Valero T Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. / T Valero // *Curr Pharm Des.* - 2014. - V. 20, № 35. – P. 5507–5509.
174. Virbasius J.V. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis / J.V. Virbasius, R.C. Scarpulla // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*– 1994. – V. 91, №4. – P. 1309–1313.
175. Ward R. Life in the alveolus: who's in charge? / R. Ward // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2000. – V. 279, № 6. – P.524-537.
176. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission / B. Westermann // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* . – 2012. – V.1817, № 10. – P.1833–1838.

177. Whelan S.P. Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between / S.P. Whelan, B.S. Zuckerbraun // *Oxid. Med. Cell Longevity*. - 2013. - V. 126, № 6. – P. 351-361.
178. William W. Chande Hypoxia regulates cellular metabolism / W. William, S. Wheaton // *Am J Physiol Cell Physiol* – 2011. – V 300, № 18. – P. 385-393.
179. Yoboue E.D. Reactive Oxygen Species-Mediated Control of Mitochondrial Biogenesis / E.D. Yoboue, A. Devin // *Int. J. Cell Biol.* – 2012. – V 287, № 18. – P. 14569-14578.
180. Youle R. J. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress / R.J. Youle, A.M. Blik // *Science*. - 2012 - V.337 № 6098. - P.1062-1065.
181. Zhou L.Y. Mitochondrial network in the heart / L.Y. Zhou, Q. Li, G.F. Gao // *Protein Cell*. - 2012 - V.3, № 6. - P.410-418.
182. Zhuang J. Protective effects of intermittent hypoxic adaptation on myocardium and its mechanisms / J. Zhuang, Z. Zhou // *Biol. Signals Recept.* – 1999. – V. 8, № 1-2. – P.316-322.
183. Zick M. Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria / M. Zick, R.Rabl, A.S. Reichert // *Biochimica Biophysica Acta (BBA) et Mol. Cell Res* – 2009. – V. 1793, № 1. – P.5–19.
184. Zieliński J. Effects of intermittent hypoxia on pulmonary haemodynamics: animal models versus studies in humans / J. Zieliński // *Eur. Respir. J.* – 2005. – V. 25, № 1. – P. 173-180.