

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
МІЖНАРОДНИЙ ЦЕНТР АСТРОНОМІЧНИХ
ТА МЕДИКО-ЕКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ПОРТНІЧЕНКО ВОЛОДИМИР ІЛІЧ

УДК 612.014.4:612.17.062 + 577.25:616.127-005.8/-007.61

**МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ГІПОМЕТАБОЛІЧНОГО СТАНУ ПРИ ГІПОКСІЇ
ТА НОВІ ПІДХОДИ ДО ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ КОРЕКЦІЇ
ГІПОКСИЧНИХ І МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі гіпоксії Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця Національної академії наук України та у відділі фізіології та патофізіології екстремальних станів Міжнародного центру астрономічних та медико-екологічних досліджень Національної академії наук України

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор,
Маньковська Ірина Микитівна,
провідний науковий співробітник відділу гіпоксії
Інституту фізіології
ім. О.О. Богомольця НАН України

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
член-кореспондент НАН України,
академік НАМН України,
Резніков Олександр Григорович,
завідувач відділу ендокринології репродукції і
адаптації
ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.
П. Комісаренка НАМН України»

доктор медичних наук, професор
Заморський Ігор Іванович,
завідувач кафедри фармакології
Буковинського державного медичного університету
МОЗ України

доктор медичних наук, професор
Абрамов Андрій Володимирович,
професор кафедри патофізіології
Запорізького державного медичного університету
МОЗ України

Захист відбудеться «20» квітня 2021 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України (01024, м. Київ, вул. Богомольця,4).

Автореферат розісланий «19» березня 2021 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради Д 26.198.01,
кандидат біологічних наук



О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Перебіг метаболічних змін при гіпоксії різного генезу та механізми їх розвитку залишаються недостатньо вивченими. Особливо загострився інтерес до проблеми в останній рік внаслідок епідемії коронавірусної інфекції COVID-19, ускладненням якої є розвиток пневмонії з важкою респіраторною гіпоксією, що призводить до значної смертності. Проте досі немає чіткого уявлення про головні закономірності змін в організмі людини і експериментальних тварин, які виникають після гострого та хронічного впливу гіпоксії, а відомі механізми охарактеризовані фрагментарно.

В основі пристосувальних процесів до дії гіпоксії лежить зменшення швидкості енергетичного метаболізму [Шик Л.С. 1954, Hill, 1959]. Основною дійовою особою розвитку цього стану є клітина, оскільки при гіпоксії знижується здатність мітохондрій виробляти АТФ в процесі окисного фосфорилування та спостерігається зниження її концентрації в клітинах. Внаслідок цього, як писав Носачка [1999], у клітини є «два виходи з цього стану – або загинути, або знизити споживання кисню». Як відомо [Lehninger, 2009], головним біоенергетичним центром клітини є мітохондрії, і зниження доставки кисню впливає саме на їх стан. Виникає каскад клітинних реакцій, пов'язаний зі стабілізацією індукованого гіпоксією фактора (HIF-1), який запускає транскрипцію великого комплексу генів, в тому числі, мітохондріальних [Semenza, 2012]; та активує інші сигнальні шляхи, в тому числі, продукування NO, що залежить від концентрації кисню в тканинах [Rangasamy, Johnes, 1991, 1996]. В той же час, подібні зміни енергетичного метаболізму різного генезу описані як гіпометаболічний стан [Gautier, 2004; Mortola, 2004, 2005].

Незважаючи на велику кількість досліджень механізмів гіпоксії і присудження Нобелівської премії у 2019 р., не досить зрозумілі місце і прояви гіпометаболічного стану при гіпоксії, особливості функціонування клітин, тканин і систем організму і, зокрема, системи транспорту кисню в цей період. Також не охарактеризовані тривалість цього стану, його наслідки, механізми його розвитку і виходу з нього при гіпоксії, відмінності при дії різних гіпоксичних режимів. Окремо стоїть питання, як можна використати одержані знання для розробки патофізіологічної корекції різноманітних захворювань. Зокрема, відомо, що гіпоксія може впливати на вуглеводний обмін і стан глікемії при адаптації до високогір'я [Woolcott, 2015]. Оскільки головним метаболічним субстратом мітохондрій є глюкоза, це вказує на можливий зв'язок компенсаторних механізмів при гіпоксії і метаболічних розладах та можливості розробки на цій основі методів корекції цих порушень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Виконання роботи проводилося в рамках наукових програм відділу гіпоксії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Механізми змін функціонального стану і структурної організації мітохондрій при оксидативному стресі різного генезу» (№ 0112U008232, 2013-2016 рр.) «Механізми розвитку та компенсації гіпоксичних та оксидативних тканинних пошкоджень при нейродегенеративних і метаболічних розладах» (№ 0116U004474, 2017-2019 рр.); наукових програм Міжнародного центру астрономічних та медико-екологічних досліджень (МЦ АМЕД) НАН

України: «Механізми розвитку гіпометаболічного стану при гіпоксії» (№ 0105U007938, 2006-2008 pp.), «Глюкозоопосередковані механізми розвитку та редукції гіпометаболічного стану різного генезу» (№ 0108U011158, 2009-2012 pp.); «Молекулярно-генетичні механізми метаболічної адаптації та деадаптації до впливу гіпоксії» (№ 0112U008196, 2013-2016 pp.), «Механізми розвитку гіпометаболічного стану різного генезу» (№ 0112U008197, 2013-2016 pp.), «Фазові зміни енергетичного метаболізму на різних етапах тривалої адаптації до гіпоксичного середовища» (№ 0117U004054, 2017-2020 pp.); спільної договірної тематики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ, МЦ АМЕД НАНУ та ДУ „Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України” „Проведення наукових досліджень з вивчення механізмів реакції організму людини на гіпоксичні впливи та клінічного застосування інтервальних нормобаричних гіпоксичних тренувань у людей з гіпертонічною хворобою, метаболічним синдромом та порушеннями толерантності до глюкози” (2014-2016); цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАНУ “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”: “Дослідження молекулярно-генетичних механізмів модуляції вуглеводного і ліпідного обміну та попередження метаболічного синдрому при впливі високогірної гіпоксії” (№ 0110U004714, 2010-2014 pp.); проекту ДФФД «Механізми цитопротективних ефектів помірної гіпобаричної гіпоксії в центральній нервовій системі та міокарді: роль гіпоксія-індуцибельного транскрипційного фактора (HIFalpha)» (№ Ф53.4/038, 2013-2014 pp.).

Мета роботи: встановити закономірності і механізми розвитку гіпометаболічного стану в умовах гіпоксії різного генезу та розробити підходи до патогенетичної корекції гіпоксичних та метаболічних порушень.

Завдання роботи:

1. На основі визначення параметрів зовнішнього та мітохондріального дихання, газообміну, терморегуляції виявити основні закономірності розвитку гіпометаболічного стану при гострій гіпоксії.
2. Встановити особливості розвитку гіпометаболічного стану при періодичній, хронічній, первинній, респіраторній гіпоксії та іммобілізаційному стресі; охарактеризувати статеві та онтогенетичні відмінності.
3. Встановити участь генетичних і молекулярних механізмів у формуванні гіпометаболічного стану і фазових змін метаболізму у періоді відновлення після дії гострої гіпоксії, хронічної гіпоксії, стресу.
4. Охарактеризувати роль глікемії як фактора метаболічної регуляції при адаптації до гіпоксичних впливів. Встановити особливості розвитку та механізмів виникнення гіпометаболічного стану при цукровому діабеті.
5. Розробити математичну модель гіпометаболічного стану.
6. Розробити концепцію гіпометаболічного стану як частини загального механізму пристосування організму до несприятливих умов існування.
7. На основі встановлених закономірностей розробити підходи до лікування респіраторної гіпоксії та цукрового діабету.

Об’єкт дослідження – перебудова енергетичного метаболізму при гіпоксичних впливах різного генезу.

Предмет дослідження – системні, клітинні і молекулярно-генетичні механізми розвитку гіпометаболічного стану при гіпоксії та патогенетична корекція гіпоксичних і метаболічних порушень.

Методи дослідження – фізіологічні, патофізіологічні, біохімічні, молекулярно-біологічні, морфологічні, математичні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше показано, що внаслідок впливу різних видів гіпоксії зміни газообміну мають фазовий характер, що послідовно проявляється як гіпометаболічна, перехідна, гіперметаболічна, адаптивна фази. Фазові зміни енергетичного обміну при різних видах гіпоксії мають особливості, пов'язані з важкістю і тривалістю гіпометаболічної та гіперметаболічної фаз. Вперше охарактеризовано особливості і механізми регуляції патерну дихання, альвеолярної вентиляції, газообміну, мітохондріального дихання у різних фазах змін енергетичного обміну. Вперше встановлено, що гіпометаболічна фаза характеризується переважним окисненням мітохондріями ФАД-залежних субстратів, а гіперметаболічна – переходом на окиснення НАД-залежних субстратів, в тому числі, ліпідних, та зростанням швидкості і ефективності окисного фосфорилування. Встановлено зв'язок рівня кортикостерону і фазових змін енергетичного метаболізму при іммобілізаційному стресі.

Вперше показано, що розвиток гіпометаболічного стану пов'язаний зі зростанням експресії HIF-1 α , тоді як у гіперметаболічній фазі його дія регулюється переважним зростанням експресії HIF-3 α . Встановлено участь в розвитку гіпометаболічного стану NO-залежного відкривання K_{ATP}-каналів мітохондрій і зниження споживання кисню, а також участі Akt-залежних сигнальних шляхів та кавеоліну-3 в забезпеченні цієї відповіді. Вперше встановлено закономірності виникнення гіпоглікемії при фазових змінах енергетичного обміну при різних видах гіпоксії та механізми її розвитку, пов'язані з активацією гліколізу та HIF-1-опосередкованим зростанням експресії глюкозних транспортерів GLUT1 та GLUT4.

Вперше розроблена математична модель, яка встановила необхідність розвитку гіпометаболічного стану в динаміці відповіді на гіпоксію і дозволяє прогнозувати зміни кисневих параметрів при різних умовах гіпоксії.

На підставі одержаних даних показано можливість експериментальної корекції гіпометаболічного стану при пневмонії, встановлено патофізіологічний механізм такої корекції на запальний процес у легенях і прояви респіраторної гіпоксії. Вперше продемонстровано лікувальний вплив розроблених режимів хронічної гіпоксії та інтервальної гіпоксії при діабеті 1 і 2 типу (на початкових стадіях) та встановлено його механізми, опосередковані HIF-1 α -залежною індукцією інсулінових рецепторів INSR, глюкозних транспортерів SLC2, субодиниць K_{ATP}-каналів KCNJ8, лептину на різних фазах метаболічної відповіді.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дослідження мають передусім фундаментальне значення, оскільки розроблена теорія фазових змін енергетичного метаболізму дозволяє прогнозувати перебіг метаболічної відповіді на гіпоксію в організмі людини і тварин в нормі і при патології, при фізичних навантаженнях та впливі екстремальних умов. Виділення фазових змін при патології

дозволяє розробити нові фармакологічні і нефармакологічні підходи до лікування захворювань, які характеризується гіпоксичними і метаболічними порушеннями. Одержані в роботі результати розвивають і доповнюють відомості про патогенез захворювань, які супроводжуються гіпоксичними і метаболічними порушеннями, компенсаторно-пристосувальні механізми, адаптивні феномени при гіпоксичних впливах і можуть бути використані у викладанні курсів патофізіології, спортивної медицини, медицини екстремальних станів в освітніх закладах медико-біологічного профілю.

Результати експериментальних та клінічних досліджень надають підстави для впровадження в клінічну практику розроблених методів корекції респіраторної гіпоксії (зокрема, при пневмоніях різного генезу) та метаболічних порушень при метаболічному синдромі та цукровому діабеті.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто виконано аналіз літературних джерел, розробку теоретичних положень роботи, планування і проведення всього обсягу експериментальних досліджень, одержання, обробку і аналіз фактичного матеріалу, узагальнення одержаних результатів, формулювання теоретичних та практичних висновків роботи, написання всіх розділів дисертації та опублікованих наукових праць. Ряд експериментів було проведено спільно зі співробітниками Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України та МЦ АМЕД НАН України, які є співавторами опублікованих робіт. При підготовці наукових праць, опублікованих із співавторами, використано огляд літератури, експериментальний матеріал, статистичні дані та теоретичні узагальнення автора.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені та обговорювалися на XXVIII European section Meeting of International Society for Heart Research (Athens, Greece, 2008 p.), V, VI, і VIII Національних конгресах патофізіологів України з міжнародною участю (Запоріжжя, 2008 p.; Сімферополь, 2012 p., Одеса, 2020 p.), XVI, XVIII, з'їздах Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Вінниця, 2002; Одеса, 2010 p.; Львів, 2016; Київ, 2018), V, VII Пленумі наукового товариства патофізіологів України (Луганськ, 2010; Полтава, 2018); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції» (Чернівці, 2017); науково-практичній конференції «Досвід і проблеми застосування сучасних морфологічних методів досліджень органів і тканин у нормі та при діагностиці патологічних процесів», (Тернопіль, 2007); IV, V, VII і VIII Всеросійських конференціях з міжнародною участю «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, Росія, 2005, 2007, 2009, 2012 p.), VI World Congress on Mountain Medicine and High Altitude Physiology, and V Annual Meeting for Chinese High Altitude Medicine (Xining, China, 2004 p.), VI Annual Ukrainian-Polish Conference “Current aspects of lung diseases: Pathophysiology, diagnostics, treatment” (Тернопіль, 2009 p.), International Conferences “Advances in Pneumology” (Warsaw, Poland, 2010 p.; Bonn, Germany, 2011 p.; Kassel, Germany, 2013 p.; Wieliczka Salt Mine, Poland, 2014; Warsaw, Poland, 2016 p.), IV і VI Всеросійській конференції з міжнародною участю «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, Росія, 2005, 2011 p.), I і II Міжнародній науковій конференції «Високогірна

гіпоксія і геном» (Терскол, Росія, 2008, 2012 р.), VI Chronic Hypoxia Symposium (2016, La Paz, Bolivia); Frontiers in CardioVascular Biology (Florenzia, Italy, 2016; Vienna, Austria, 2018); ESC Congress (2017, Barcelona, Spain); на спільному засіданні Київського товариства патофізіологів та сектора вісцеральних систем (2012 р.) та на засіданні Вченої ради Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (12 січня 2021 р.).

Наукові публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 62 наукових працях, в тому числі 30 статтях у вітчизняних та іноземних наукових виданнях фахового спрямування, з них 13 статей входять в бази даних Web of Science, Scopus з них 3 статті у виданнях Q1, 4 - в Q2 і 1 - в Q3; а також 2 патентах та 33 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 334 сторінках та ілюстровано 134-ма рисунками та 14-ма таблицями. Текст дисертації вміщує вступ, огляд літератури, опис методики, 7 розділів результатів, аналіз та узагальнення цих результатів, висновки та список літератури, в якому наведено 512 джерел.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено основні відомості про розвиток гіпометаболічного стану та наведено сучасні дані стосовно механізмів його розвитку. Показано, що основним критерієм розвитку цього стану є зниження продукції АТФ у клітині, що і призводить до енергодефіциту.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження проведено на 565 щурах лінії Вістар. Основну частину досліджень проведено на самцях віком 5-7 міс, масою 260-400 г, окремі серії досліджень проводили на тваринах обох статей, а також щурах віком 12 міс. Частину досліджень проводили на щурах лінії Вістар, акліматизованих до середньогір'я у віварії МЦ АМЕД (Приельбрусся, 2100 м н.р.м.) у 3-5 поколінні. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції (Страсбург, 1986) та положенню Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Реєстрація показників дихання, температури і метаболічних показників проводилася одночасно в дослідних та контрольних групах протягом всього дослідження. Зразки для молекулярних досліджень відбирали через добу після останнього сеансу впливу гіпоксії або стресу. Виведення тварин з експерименту проводилося шляхом наркотизування уретаном (1,5 г/кг) та вилучення фрагментів тканин з грудної порожнини.

Гіпоксичні впливи. Вплив гострої гіпоксії (ГГ) помірної інтенсивності здійснювали шляхом «підйому» у барокамері на висоту 5600 м на 3 год. Вплив періодичної гіпоксії (ПГ) проводили шляхом «підйому» у барокамері на висоту 5600 м на 1 год кожні 3 доби. Вплив хронічної гіпоксії (ХГ) проводили в умовах середньогір'я (2100 м н.р.м.), частину тварин додатково піддавали ГГ або ПГ. Для дослідження впливу переривчастого гіпоксичного тренування (ІГТ) щури дихали газовою сумішшю 12% кисню в азоті в циклічному режимі (15 хв дихання сумішшю, 15 хв – повітрям, 5 циклів за сеанс) щоденно впродовж 14 діб. Гострий гіпоксичний

тест здійснювали перебуванням тварин в гіпоксичній камері з 7% концентрацією кисню при 30 хвилинній експозиції. Моделювання первинної тканинної гіпоксії (ПТГ) здійснювали за допомогою блокади I комплексу електронтранспортного ланцюга мітохондрій (ЕТЛ МХ) введенням 3 мг/кг ротенону щоденно протягом 2 тижнів. Респіраторну гіпоксію досліджували на моделі гострої пневмонії, яку відтворювали за допомогою введення ліпополісахариду *E. coli* (ЛПС, 1 мг/кг в/о), для корекції застосовували препарат наночастинок діоксиду церію (0,6 мг/кг, в/о).

Імобілізаційний стрес (ІС) моделювали утриманням щурів у положенні лежачи на спині на протязі 6 годин у спеціальних камерах. Для моделювання хронічного стресу використовували більш м'яку модель ІС з використанням пластикових туб, щурів іммобілізували щоденно протягом 14 днів. Для вивчення ролі K_{ATP} -каналів в/о вводили активатор ПФ-5 (1 мг/кг) або блокатор глібенкламід (5 мкг/кг).

Об'ємно-часові параметри дихання та газообміну реєстрували у ненаркотизованих щурів за допомогою комп'ютеризованої установки для дрібних тварин (з використанням спеціальної дихальної маски) та маспектрографа МХ-6202. Альвеолярну вентиляцію розраховували по кисню за рівнянням Бора. Показники об'ємів приводилися до системи VTPS, показники газообміну приводилися до системи STPD. **Термометрію** здійснювали електротермометром для дрібних лабораторних тварин.

Концентрацію глюкози та ліпідів у периферичній крові визначали за допомогою глюкометра OneTouch Select (США) і біохімічного аналізатора CardioCheck Professional (США). **Концентрацію кортикостерону** в плазмі крові щурів визначали флуориметричним методом [Балашов, 1990].

Функцію ізольованих мітохондрій досліджували у мітохондріях печінки та міокарда, виділених методом диференційного центрифугування [Kondrashova, 2001]. Концентрацію білка визначали методом Лоурі [Lowry, 1951]. Процеси дихання та окислювального фосфорилування досліджували полярографічним методом [Chance, 1955] при використанні таких субстратів окиснення (в мкМ): сукцинат - 0.35 (Ск); глутамат - 3 та малат - 2.5 (Гл); пальмітоїл-І-карнітин - 25 та малат - 2.5 (Пм), а також роз'єднувача окиснення та фосфорилування СССР (25 мкМ). Визначали швидкість фосфорилуючого (V3) та контрольованого (V4) дихання мітохондрій, дихальний контроль за Чансом (V3/V4), коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О), резерв дихального контролю (РДК) - співвідношення значення V3 з додаванням СССР до V3 без роз'єднувача [Estabrook, 1967].

Морфологічні дослідження здійснювали методом світлової мікроскопії у зразках міокарда та легень після фіксації 10%-вим нейтральним формаліном і забарвлення гематоксилін-еозином [Кисели, 1962].

Клінічні дослідження проведено на 63 добровольцях віком 40-70 років, жителів рівнини, серед них 29 чоловіків і 35 жінок, та 60 жителів середньогір'я такого ж віку (23 чоловіка та 37 жінок), в тому числі 64 практично здорових і 59 хворих на метаболічний синдром, предіабет (гіперглікемію натще і порушення толерантності до глюкози), цукровий діабет 1 і 2 типу, визначені за критеріями

Американської діабетичної асоціації (2014). Дослідження проведено згідно з вимогами діючого законодавства України та етичними принципами Хельсінкської Декларації (1964), погоджено Комітетом з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України і Локальним комітетом з біоетики ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМНУ». Групи здорових добровольців та пацієнтів, які порівнювалися у серіях досліджень, не мали вірогідних відмінностей за показниками статі і віку.

Гіпоксичні впливи на здорових добровольців і пацієнтів виконувалися під постійним контролем лікаря. Вплив ХГ здійснювався шляхом перебування на висоті 2100 м н.р.м., ГГ – шляхом пасивного підйому на висоту 3800 м на 3 год. Вплив переривчастої гіпоксії (ІГТ) здійснювався за допомогою спеціальної маски у положенні сидячи з використанням апарата «Гіпотрон» (НТТУ «КП», Україна), тричі на тиждень, у кількості 9 сеансів, кожний з яких складався з 4 впливів гіпоксії (5 хв дихання газовою сумішшю з 12% O₂ у повітрі), які чергувалися з періодами нормоксії (5 хв дихання атмосферним повітрям).

Клінічні та біохімічні обстеження здорових добровольців і пацієнтів проводилися на базі МЦ АМЕД НАН України та на базі клініки ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМНУ». Проводили стандартний тест толерантності до глюкози шляхом вживання 75 г глюкози натще. Метаболічний профіль плазми крові визначали натще за допомогою глюкометра OneTouch Select (США), біохімічних аналізаторів CardioCheck Professional (США), BTS-330 з використанням наборів «BioLATEST Lachema Diagnostica». Артеріальний тиск вимірювали ртутним сфігмоманометром Etkameter 3000 (Німеччина).

Визначення експресії мРНК в тканинах щурів проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі зворотною транскрипцією. РНК виділяли із заморожених зразків за допомогою набору реактивів Trizol RNA-Prep (“Isogene”, Росія). Концентрацію РНК після її виділення визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND1000 („NanoDrop Technologies”, США). Зворотну транскрипцію здійснювали з 150-200 нг тотальної РНК з використанням набору реактивів RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва). Одержану одноланцюгову ДНК використовували у ПЛР для ампліфікації фрагментів генів, які кодують β-актин (внутрішній контроль) і досліджуваний ген. Послідовність нуклеотидів у праймерах для ампліфікації була такою: прямий – 5'-TCA TCA CTA TCG GCA ATG AGC-3', зворотний – 5'-GGC CAG GAT AGA GCC ACC A-3' для гену β-актину; прямий – 5'-TGC TTG GTG CTG ATT TGT GAA-3', зворотний – 5'-TAT CGA GGC TGT GTC GAC TGAG - 3' для гену HIF-1α; прямий – 5'-AGA GAA CGG AGT GGT GCT GT-3', зворотний - 5'-ATC AGC CGG AAG AGG ACT TT - 3' для гену HIF-3α. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmp System 2700” (“Applied Biosystems”, США). Ампліфікація фрагментів зазначених генів складалася з 34 циклів: денатурація - 94°C (1 хв), відпалювання праймерів - 58°C (50 сек) і елонгація - 74°C (1 хв).

Експресію мРНК у пацієнтів досліджували в лейкоцитах периферичної крові, відібраної в динаміці дослідження, методом кількісної ПЛР в реальному часі за допомогою термоциклера 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems, USA).

Експресію генів HIF-1a (Assay ID: Hs00153153_m1), SLC2A1 (Hs00892681_m1), INSR (Hs00961554_m1), KCNJ8 (Hs00958961_m1) визначали з використанням TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, США). Експресію генів у кожному зразку нормалізували до експресії β -актину, використовуючи TaqMan human β -actin control reagent. Розрахунок здійснювався з використанням програмного забезпечення 7500 Fast System SDS software (Applied Biosystems).

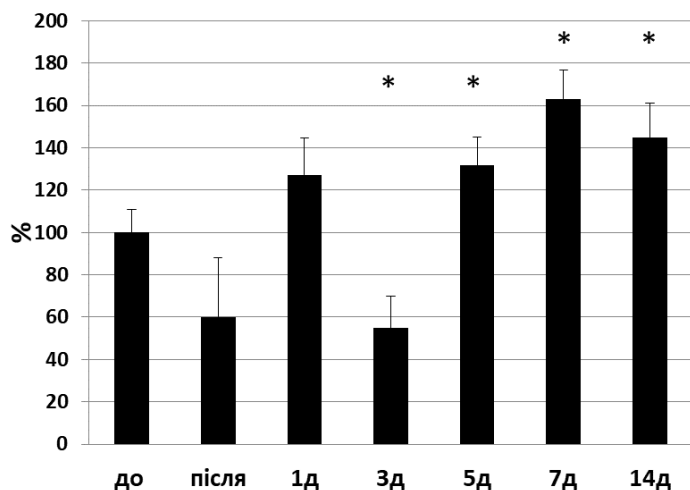
Визначення експресії білків проводили методом імуноблотингу за допомогою обладнання та протоколів “BIO-RAD Labs” (США), з використанням антитіл та реактивів фірм “Sigma”, “BD BioSciences” (США). Експресію білків у пацієнтів визначали в плазмі крові. Зразки тканин шурів піддавали гомогенізації, лізису та центрифугуванню, у супернатантах визначали вміст білка біцинхоніновим методом за допомогою набору реактивів BCA-1 (“Sigma”). Зразки (по 50-100 мкг білка) розділяли методом вертикального гелі-електрофорезу у системі SDS-PAGE з використанням апарату MINI PROTEAN 3 (“BIO-RAD Labs”). Трансфер розділених білків на PVDF-мембрани здійснювали на апараті MINI TRANSBLOT CELL (“BIO-RAD Labs”). Для блокування мембрани застосовували буфер з додаванням 4% желатину або розчин для блокування (Western blocking solution, “Sigma”), інкубували 2 год з первинними антитілами, відмивали та інкубували з вторинними антитілами протягом 1 год. Розведення антитіл визначали за рекомендаціями виробника. Імунозв’язування і детекцію білків виконували за допомогою наборів реактивів ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit (EXTRA-3, “Sigma”) та ProteoQwest Colorimetric Western Blotting Kit (“Sigma”). В якості вторинних антитіл використовували видоспецифічні IgG, мічені пероксидазою хрину. Для детекції білків застосовували кольорову реакцію з субстратами TMB або аміноетилкарбазолом. Інтенсивність забарвлення визначали за допомогою комп’ютерної денситометрії та представляли в у.о.

Статистичну обробку результатів виконували загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням програми SPSS 21.0 (SPSS Inc., USA). Для оцінки статистичної значимості відмінностей між групами даних в дослідженні, за умови нормального розподілу, використовували t-критерій Стьюдента, а також однофакторний дисперсійний аналіз з апостеріорними попарними t-тестами з post hoc поправкою Геймса-Хуела. Динамічні параметри оцінювали з використанням one-way, two-way або three-way analysis of variance (ANOVA repeated measurements), для нормального розподілу і post hoc з поправкою Bonferroni. В інших випадках використовувалися непараметричні методи - аналіз Краскела-Уолеса з апостеріорними попарними тестами Манна-Уїтні з поправкою Бонфероні. Кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнта r за Pearson. Рівень статистичної значущості приймали за $P < 0,05$. Результати представляли у вигляді $M \pm m$ або $M \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив гострої гіпоксії (ГГ) на газообмін, температуру тіла, глікемію, паттерн дихання і альвеолярну вентиляцію

Одразу після впливу ГГ зміни газообміну у щурів характеризувались



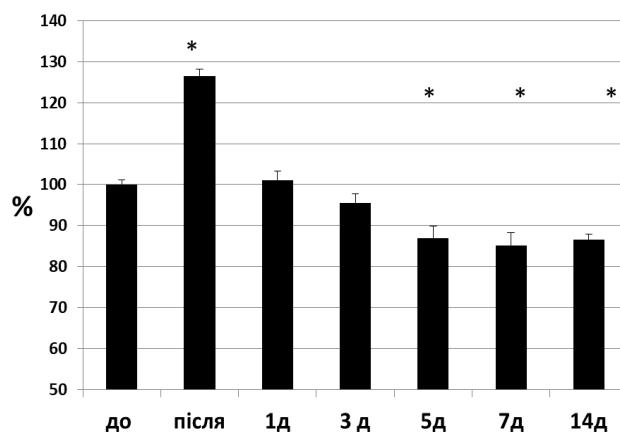
зниженням споживання кисню (\dot{V}_{O_2} , рис.1), яке віддзеркалює зменшення енергетичного обміну організму. Це супроводжувалось падінням температури тіла, що непрямо свідчить про економізацію роботи мітохондрій по забезпеченню енергетичними субстратами.

Рис. 1 Споживання кисню у періоді відновлення після гострої гіпобаричної гіпоксії. (Тут і далі - $M \pm m$.) * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.

При цьому виникала гіперглікемія, як стресорна реакція, яка викликає тимчасове гальмування транспорту глюкози у клітину за рахунок викиду контрінсулярних факторів (рис. 2). Як наслідок, зниження споживання кисню зменшувало навантаження на систему дихання, що проявлялось зниженням вентиляції легень, обумовленим зменшенням дихального об'єму (V_T).

Рис.2. Зміни рівня глюкози у крові щурів в періоді відновлення після ГГ. * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.

як стресорна реакція, яка викликає

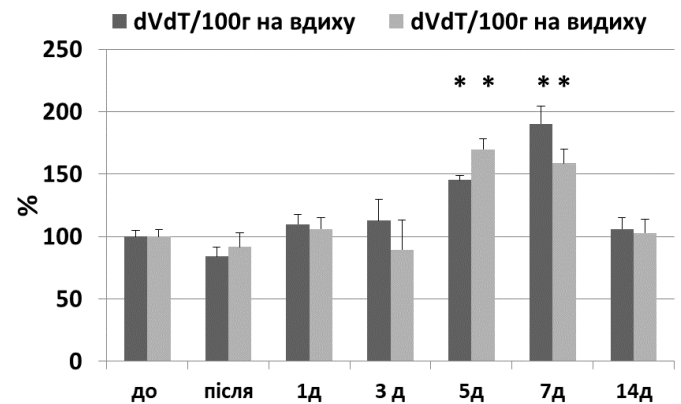


Ефективність дихання (вентиляційний еквівалент кисню) суттєво не змінювалась, проте кисневий ефект дихального циклу значно падав, що може непрямо свідчити про скорочення дифузійної поверхні легень.

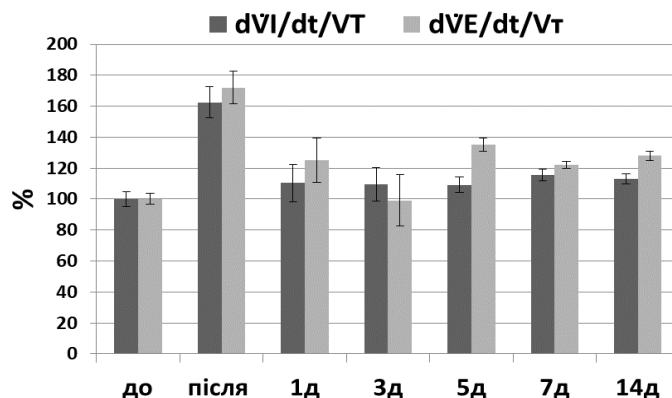
Поглиблений аналіз дихальної кривої і часових інтервалів дозволяє з'ясувати біомеханічні зміни в легенях, які можуть бути в основі формування патерну дихання. Однією з причин змін патерну дихання є підвищення показників, які характеризують біомеханіку легень; можна констатувати, що після ГГ $d\dot{V}_I/dt$ на вдиху і на видиху істотно не змінювались (рис. 3). Але в цей термін відмічали значне зростання співвідношення $d\dot{V}_I/dt$ до V_T (рис. 4), що вказує на підвищене зусилля легеневої мускулатури по здійсненню вдиху і видиху внаслідок значно збільшеного опору диханню. Це співпадає з дослідженнями інших авторів, зокрема, Ф.З. Меєрсона (1981), який ввів поняття «інтенсивності функціонування структур», що може слугувати однією з передумов переходу організму до гіпометаболічного стану.

Про підвищену участь центральної нервової системи у формуванні вдиху свідчать зміни часових показників дихання. Відомо, що відношення часу вдиху до загальної тривалості дихального циклу – «корисний цикл» [Guthrie et al., 1980], відображає «центральный вплив» на патерн дихання, оскільки вдих здійснюється активно, а видих – пасивно. Тому подовження тривалості вдиху свідчить про збільшення центрального впливу на патерн дихання. Вже відразу після дії ГГ спостерігається збільшення «корисного циклу» з одночасним укороченням T_I/T_{tot} . Інформативною величиною, яка відображає центральну

Рис. 3. Зміни $d\dot{V}/dt$ після ГГ. * $P<0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.



імпульсну активність (ЦІА), є середня швидкість потоку повітря на вдиху (\bar{V}_I). Оскільки неодмінною умовою активності дихальних нейронів є наявність тонічного входу – надходження аферентної імпульсації від хеморецепторів, що визначають



рівень ЦІА, то цей показник також відображає інтенсивність хеморецепторної стимуляції дихання – так званого «драйву» [Gautier, 1979]. Все це свідчить про суттєво підвищений вплив з боку центральної нервової системи.

Рис. 4. Зміни $d\dot{V}/dt/V_T$ після ГГ. * $P<0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.

Проте вже через добу після дії ГГ спостерігали суттєве відновлення показників дихання, обумовлене зменшенням опору диханню в легенях. Це сприяє нормалізації рівнів споживання кисню та глюкози крові, а також показників патерну дихання та біомеханічних властивостей легень, тощо. На третю добу реєстрували вірогідне зниження енергетичного обміну, яке не супроводжувалось суттєвими змінами патерну дихання, біомеханічних властивостей легень. Однак змінювалась ефективність дихання, суттєво зростав вентиляційний еквівалент кисню і знову підвищувався кисневий ефект дихального циклу, що свідчить про «холосту» роботу легень по доставці кисню в цей період. Внаслідок зниження парціального тиску CO_2 в альвеолах P_{CO_2} і зростання P_{O_2} спостерігався синдром «гіпервентиляції альвеол». Ці зміни були обумовлені суттєвим зниженням споживання кисню тканинами організму при відсутності суттєвих перешкод на шляху його доставки.

Після 5-ї доби починається зростання показників патерну дихання і газообміну, обумовлене перш за все збільшенням споживання кисню, рівень глюкози крові поступово знижується нижче вихідних значень. Підвищення метаболічних потреб

тканин у кисні супроводжується переналаштуванням патерну дихання. На п'яту і особливо на сьому добу спостерігалось зростання вентиляції легень за рахунок збільшення глибини дихання і тенденції до зменшення його частоти. Через 2 тижні спостерігалось зменшення вентиляції легень до вихідного рівня за рахунок зменшення глибини дихання і підвищення частоти дихання. Цікаво, що при цьому не спостерігається зростання «корисного циклу» T_I/T_{tot} , проте значно зростає «драйв» \bar{V}_I ($P < 0.05$), що свідчить про інтенсивну хеморецепторну стимуляцію дихання, проте суттєвого опору на вдиху, для подолання якого треба подовжувати вдих, не було відмічено.

Про це ж свідчать встановлені показники біомеханіки легень: до 5-ї доби не відмічалися зміни $d\dot{V}/dt$ на вдиху і на видиху, але з цього часу спостерігається їх зростання. Можна відмітити, що на п'яту добу реєструється більше зростання $d\dot{V}_E/dt$ на видиху, а з 7-ї доби – на вдиху. Це може свідчити про поступове «розтягування» легень і підготовку до зростання навантаження підвищеним споживанням кисню. Пре це також свідчить суттєве зростання $d\dot{V}/dt / V_T$ на видиху на 5 добу, тоді як на 7 добу вірогідних змін цього показника не спостерігається. На 14 добу відбувалася нормалізація показників дихання і газообміну.

Таким чином, можна виділити декілька фаз змін енергетичного метаболізму в періоді відновлення після гострої гіпоксії. Перша фаза (1-5 доба) – гіпометаболічна, пов'язана зі значним зниженням енергетичного метаболізму, 2-га фаза – перехідна (5 доба), пов'язана з початком зростання енергетичного метаболізму, 3-тя фаза – гіперметаболічна (5-14 доба), пов'язана зі значним зростанням енергетичного метаболізму і 4-та фаза - адаптивна (з 14-ї доби) - встановлення газообміну на новому енергетичному рівні.

Морфологічні зміни в кардіореспіраторній системі у щурів після впливу ГГ

ГГ супроводжувалася вираженими морфологічними змінами в органах кардіореспіраторної системи. В легенях формувалася комплекс структурних змін, що охоплював бронхіальне дерево та респіраторний відділ. Тканина легень характеризувалася нерівномірністю повітряності: емфізематозні локуси перемежувалися з локусами ателектазу. Значне пошкодження судинних стінок сприяло перибронхіальним та периваскулярним набрякам та геморагічному просяканню тканини легень. Вогнища надзвичайно тонких міжальвеолярних септ поєднувалися з розвитком в них локальних потовщень за рахунок набряку та інфільтрації лімфоїдними елементами з домішками окремих сегментоядерних лейкоцитів та поодиноких плазмочитів. У міокарді реєстрували дисциркуляторні розлади, які проявлялися спазмом мілких артерій та артеріол, престазом і стазом, еритропедезом, периваскулярними набряками. Капіляри, венули та дрібні вени були різко розширені, повнокровні. В стінках судин відмічалось набрякання, проліферація та вогнищева десквамація ендотелію. Кардіоміоцити знаходились у стані зернистої та вакуольної паренхіматозної дистрофії з помірним порушенням поперечної та продольної посмугованості, вогнищами фрагментації, контрактурних порушень та некрозом окремих клітин, що було відсутнім у контрольних тварин. Ступінь гістоструктурних порушень був більш виражений у лівому шлуночку. Регенераторні процеси у міокарді після ГГ були різко знижені у порівнянні з

контрольною групою. Кількість клітин у стадії поділу на 1000 клітин становила $0,38 \pm 0,08$ у лівому і $0,49 \pm 0,01$ у правому шлуночках серця (в порівнянні до контролю $p < 0,01$).

Таким чином, ГГ викликала дисциркуляторні порушення та розвиток цитолітичних та некротичних процесів різного ступеня вираженості, запальних та імунних процесів. Ці значні порушення в тканинах організму обумовлюють виникнення захисного гіпометаболічного стану, про що непрямо свідчить зниження мітотичної активності у міокарді.

Вікові особливості та NO-опосередковані механізми реакції паттерну дихання, альвеолярної вентиляції і газообміну на ГГ

Дослідження газообміну засвідчили вікові особливості розвитку гіпометаболічної реакції про впливі ГГ у щурів. Її розвиток був швидким і виразним у 6-місячних (молодих) щурів, він спостерігався безпосередньо під час гіпоксичного впливу і підтримувався у відстроченому періоді. Оскільки iNOS індукується протягом доби після гіпоксичного впливу, зменшення споживання кисню може бути пов'язано з гальмівною дією NO на функцію мітохондрій. При дослідженні впливу ГГ на індукцію білка iNOS у легенях та правому серці було виявлено, що у щурів молодого віку експресія iNOS у міокарді виразно зростала після ГГ і була значно вищою, ніж у легенях..

На відміну від цього, у 12-місячних (зрілих) тварин гіпометаболічна реакція розвивалася поступово і у відстроченому періоді поглиблювалася. Рівень експресії iNOS в міокарді у них був вдвічі меншим, а після впливу ГГ зменшувався у 2,5 рази. Експресія iNOS в легенях зростала у зрілих тварин порівняно з молодими, а вплив ГГ призводив до виразної індукції ензиму у легенях.

Значні відмінності експресії білків тварин у тварин зрілого віку можуть бути пов'язані з віковим послабленням синтетичних процесів у міокарді і неможливістю розвитку швидкої і достатньої реакції на вплив індуктора. В той же час у легенях цих тварин відбувається зростання показників експресії білка, яке може мати компенсаторний характер з огляду на зменшення ролі правого серця як джерела регуляторних факторів для пульмонарної циркуляції.

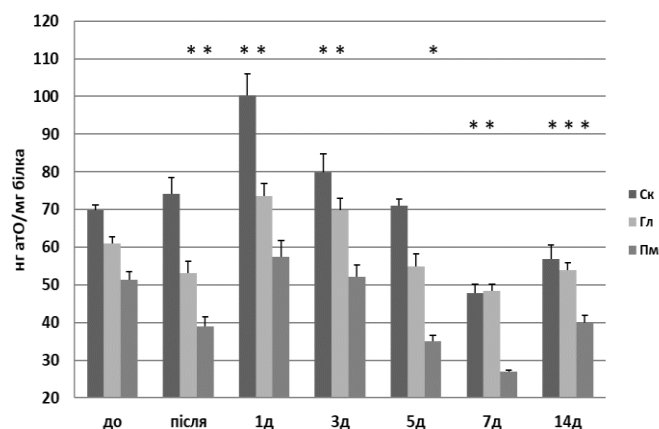
Отже, система дихання у щурів молодого і зрілого віку має різну толерантність до гіпоксичного навантаження: якщо щури молодого віку реагують негайно на гіпоксичний вплив, то щури зрілого віку демонструють поступовий розвиток реакції на гіпоксію, що може бути пов'язано з відмінностями експресії у них індукцибельних ензимів, зокрема iNOS. У молодих тварин регуляція забезпечення організму киснем при гіпоксії значною мірою реалізується через функцію і перебудову метаболізму міокарду правого серця, тоді як у зрілому віці зростає роль компенсаторних механізмів, які розвиваються в легенях.

Зміни мітохондріального дихання в періоді відновлення після дії ГГ

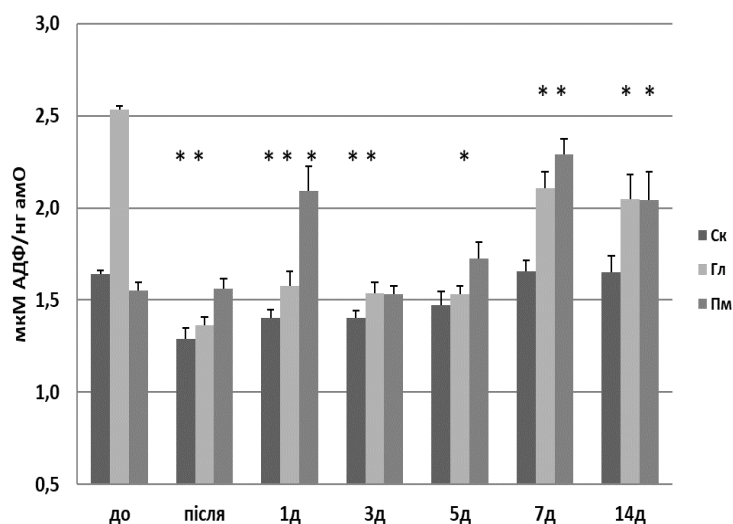
Механізми, які лежать в основі змін споживання кисню організмом, залежать від функціонування аеробної частини енергетичного метаболізму. Для їх виявлення досліджували стан мітохондріального дихання в печінці в динаміці відновлення після сеансу ГГ.

Відразу після ГГ знижувалась швидкість окиснення субстратів Гл і Пм в активному метаболічному стані 3 (V3, рис. 5). Через добу зростало окиснення всіх субстратів, особливо ФАД-залежного Ск, яке знижувалося на 3-ю добу. Надалі спостерігалось зниження фосфорилуючого окиснення всіх ФАД- і НАД- залежних субстратів мітохондріями з мінімумом на 7 добу після ГГ. До цього часу швидкість окиснення субстратів в дихальному ланцюгу мітохондрій печінки була істотно нижчою, ніж у вихідному стані.

Рис. 5. Дихання мітохондрій в метаболічному стані V3 в періоді відновлення після ГГ. * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.



Після 7 діб відзначалося переключення енергетичного метаболізму і вже на 14 добу - поступове відновлення швидкості фосфорилуючого окиснення всіх досліджуваних субстратів. Однак показники V3 залишаються вірогідно нижчими, ніж вихідні дані, особливо це стосується швидкості окиснення Гл.



Економічність окислювального фосфорилування визначає АДФ/О – показник, який демонструє, скільки молекул АТФ утворюється при споживанні одного атома кисню. Відразу після сеансу ГГ (рис. 6) спостерігали значне падіння економічності окиснення Гл і Ск (майже в 2 рази).

Рис. 6. Зміни АДФ/О в періоді відновлення після ГГ. * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.

Через добу реєстрували зростання АДФ/О при окисненні Ск і Гл та більш значне – при окисненні Пм, яке знижувалося на 3 добу. Надалі виявлено достовірне зростання економічності окислювального фосфорилування при окисненні Ск, цей показник досягав контрольного рівня на 7 добу і надалі залишався сталим. АДФ/О при окисненні Пм і Гл максимально зростали після 7 сеансу ГГ.

Для оцінки резервної потужності мітохондрій використовували показник РДК (рис. 7). Відразу після ГГ РДК значно знижувався, на третю добу - досягав мінімальних значень. На 5-7 добу він зростав, значно перевищуючи контрольний рівень.

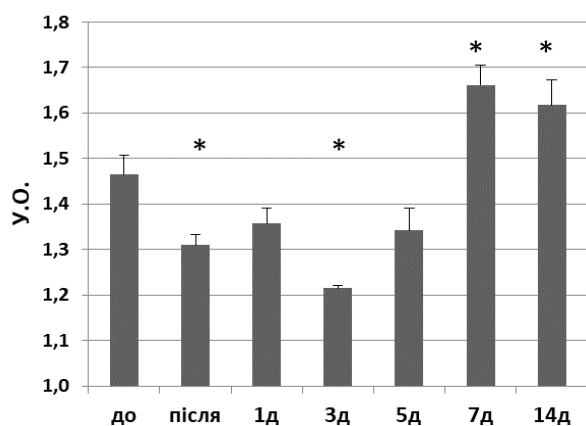


Рис. 7. Зміни РДК під час періоду відновлення після 3 годинної гіпобаричної гіпоксії. * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.

Зміни експресії факторів транскрипції HIF-1 α і HIF-3 α та їх вплив на розвиток гіпометаболічного стану в періоді відновлення після ГГ.

Відомо, що субодиниці транскрипційних факторів HIF-1 α і HIF-3 α стабілізуються при гіпоксії і активно впливають на енергетичний метаболізм клітин [Semenza G., 2013]. Нами було виявлено зростання експресії мРНК HIF-1 α і HIF-3 α ($P < 0.05$) в міокарді через 1 і особливо через 7 діб після ГГ з наступною нормалізацією (рис. 8). Слід зауважити, що експресія HIF-1 α на початку зростала більшою мірою, ніж HIF-3 α , але з 7 доби відбувалося вирівнювання експресії обох факторів. Враховуючи гальмівну дію HIF-3 α на HIF-1 α (SL Yang, 2015), можна дійти висновку, що в цей термін зростала гальмівна регуляція HIF-1 α , що може бути фактором виходу клітин з гіпометаболічного стану.

Таким чином, можна припустити, що експресія факторів транскрипції HIF-1 α і HIF-3 α впливає на розвиток гіпометаболічного стану і опосередковує фазові зміни енергетичного метаболізму, зазначені вище.

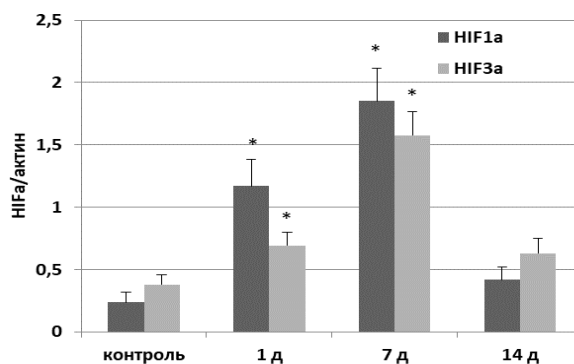


Рис. 8. Динаміка експресії мРНК HIF1 α і HIF3 α в міокарді на різних етапах відновлення після ГГ.

* $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.

Цій динаміці відповідали і показники експресії HIF-1 α -залежних білків протеїнкінази Akt, MnSOD и кавеоліну 3. MnSOD і кавеолін 3 відзначалися максимальною індукцією ($P < 0.05$) в першій фазі періоду відновлення, коли вони опосередковували цитопротекторні механізми, згодом їх експресія частково знижувалася в гіперметаболічній фазі. Проте протеїнкіназа Akt після індукції в гіпометаболічній фазі демонструвала реіндукцію в гіперметаболічній фазі ($P < 0.05$). Індукція всіх білків, що вивчалися, у відповідь на гіпоксію була більш значною і швидкою у міокарді правого шлуночку серця порівняно з лівим.

Виявлені загальні закономірності фазових змін у міокарді пов'язані з різними механізмами клітинного захисту. У гіпометаболічній фазі відбувалося зростання

синтезу активних метаболітів кисню внаслідок дисфункції мітохондрій. Водночас підсилювався антиоксидантний захист за рахунок вільнорадикальної та гіпоксичної індукції мітохондріальної супероксиддисмутази MnSOD. З іншого боку, за рахунок гіпоксичної індукції скаффолд-протеїна кавеоліна-3 посилювалися механізми захисту клітин, пов'язані з мембраною. Кавеолін-3 є основою мембранних кавеол, які, зокрема, слугують депо для eNOS і створюють резервні потужності активації синтезу NO через Akt/eNOS-опосередковані сигнальні шляхи. Експресія цих білків зростала тільки в гіпометаболічній фазі. На відміну від цього, кіназа Akt, задіяна у множинних сигнальних механізмах відповіді на клітинний стрес, активувалася двічі: в гіпометаболічній фазі ці ланки сприяли антиапоптотичним ефектам, mTOR-залежному посиленню синтезу білків і репаративним процесам, а в гіперметаболічній фазі переважали Akt-опосередковані метаболічні зміни.

Розвиток ГМС при ГГ за умов модуляції активності K^+ _{АТФ}-залежних каналів. K^+ _{АТФ}-залежні канали відіграють важливу роль в енергетичному метаболізмі клітин, встановлено, що їх активатори (АКК) сприяють виходу іонів K^+ з клітини і підвищенню в ній концентрації іонів Ca^{2+} , виникає гіперполяризація мембрани і зменшується збудливість клітини. Найбільш вираженою є дія на судинний тонус, гіперполяризація гладеньких м'язів судин призводить до зниження артеріального тиску, також виявлено гіперполяризацію легених нейронів, зниження гіперреактивності бронхів і зменшення бронхоконстрикції. Було показано, що після дії активатора АКК (ПФ5) виникала толерантність до ГГ: підвищення параметрів дихання (особливо зростав кисневий ефект дихального циклу) було достатньо для забезпечення доставки кисню тканинам. Гіпометаболічний стан після дії ГГ не розвивався, а одержаний позитивний ефект міг обумовлюватися зниженням гіпоксичної вазоконстрикції. Таким чином, вплив АКК попереджував розвиток гіпометаболічного стану при дії гострої гіпоксії, що свідчить про пряму участь K^+ _{АТФ}-залежних каналів в механізмі його розвитку.

Вплив інгібітора ангіотензинперетворюючого ферменту на розвиток гіпометаболічного стану після ГГ характеризувався загалом позитивною динамікою змін в порівнянні з контрольною групою. Спостерігалася менш виражена гіпометаболічна реакція, зменшувалися порушення паттерну дихання і газообміну порівняно з контролем. Це може бути пов'язано з впливом блокатора на системний кровообіг і в особливості на судини малого кола кровообігу, внаслідок чого не виникала виражена гіпоксична вазоконстрикція.

Основні закономірності змін паттерну дихання, газообміну, енергетичного метаболізму при періодичній гіпоксії (ПГ) у щурів

Періодичну гіпобаричну гіпоксію можна представити як серію гострих гіпоксичних впливів з досить тривалими нормоксичними перервами (від однієї до декількох діб), на чому ґрунтується її істотна відмінність від переривчастої (intermittent) гіпоксії, коли тривалість гіпоксичних і нормоксичних епізодів обчислюється хвилинами. Ці відмінності, перш за все, можуть бути пов'язані з функцією клітинного кисневого сенсора HIF-1 α , який стабілізується при нестачі кисню і дестабілізується при нормоксії [Semenza, 2013]. Тому активність цього білка як фактора транскрипції адаптивних генів може суттєво відрізнятися в залежності

від параметрів гіпоксичного режиму. Для експресії індукцибельних генів, як правило, необхідно кілька годин, а тривалість експресії генів-ефекторів клітинного стресу, до якого можна віднести і кисневу депривацію, становить декілька діб. Накладення нового гіпоксичного епізоду в періоді активної гострої адаптації здатне внести різноспрямовані корективи в пристосувальні процеси, опосередковані генетичною активацією. Однак відмінності гіпоксичних режимів з точки зору індукції адаптивних генів надзвичайно мало вивчені.

У зв'язку з цим виникає закономірне питання: як гіпометаболічна реакція, що виникла після сеансу гіпоксії, впливає на проведення наступного сеансу гіпоксії, які зміни відбуваються з аеробної частиною енергетичного обміну в період після одного сеансу у відповідь на наступний сеанс, чи зберігається гіпометаболічна реакція в процесі ПГ. Ці питання не висвітлені в сучасній літературі. Для вивчення таких процесів найбільш доцільним є проведення гіпоксичних сеансів з періодичністю кожні 3-4 доби, що адекватно співвідноситься з термінами експресії адаптивних генів.

Основними характеристиками динаміки показників при ПГ було зниження споживання кисню і розвиток гіпометаболічного стану, який виникав вже після першого сеансу. В подальшому, на 4-5 сеансах ПГ, спостерігалось зростання споживання кисню. На підставі цих даних можна зробити висновок про існування при ПГ, як і в періоді відновлення після ГГ, чотирьох фаз змін енергетичного метаболізму: перша – фаза первинного гіпометаболічного стану, друга – перехідна фаза, третя – фаза відновлення енергетичного метаболізму або гіперметаболічна, і четверта (під час дослідження ми спостерігали лише її початок) – адаптивна фаза. Суттєвою різницею між ГГ і ПГ є тривалість фаз: якщо після ГГ 1-ша фаза триває біля 5 діб, то після ПГ – близько 9 діб.

Динаміка змін температури тіла (Тт) у щурів-самців свідчить про поступове зростання стійкості функції термогенезу до сеансів ПГ. Зміни Тт у самиць мали значні відмінності від самців: у перших вони свідчили не тільки про повне відновлення термогенезу, а й про його зростання, можливо, в якості механізмів запобігання гіпоксичному пошкодженню. За динамікою змін Тт у самиць після сеансів ПГ можна припустити, що темпи відновлення термогенезу у них набагато швидші, ніж у самців. Це може супроводжуватися обмеженою можливістю знизити кисневий запит у самиць і нездатністю системи доставки кисню забезпечити його. Внаслідок цього можливий розвиток вторинної тканинної гіпоксії і метаболічного ацидозу, що непрямо відображується у підвищенні дихального коефіцієнта у цих тварин.

Зміни мітохондріального дихання в процесі ПГ носили такий же яскраво виражений фазовий характер, як у періоді відновлення після ГГ. Під час гіпометаболічної фази через добу після сеансу зростали V3 і АДФ/О при використанні всіх субстратів окиснення в обох шлуночках міокарду, що свідчить про стимуляцію компенсаторних механізмів, спрямованих на підтримку продукції АТФ, в той час як загальний гіпометаболізм і обмеження споживання кисню тканинами захищає їх від гіпоксичного ушкодження. В цей час також компенсаторно обмежується термогенез. Однак це супроводжується значним

зниженням дихального контролю $V3/V4$ і АДФ/О, виснаженням резервів мітохондріального дихання, що свідчить про порушення роботи ЕТЛ МХ і різке падіння ефективності. Термінова компенсація внаслідок системних реакцій і індукції генів при кожному гіпоксичному сеансі в метаболічну фазу виявляється недостатньою. Друга фаза, перехідна, виникає, незважаючи на гіпобаричний вплив, що триває. У третій фазі, гіперметаболічній, активується комплекс регуляторних механізмів із залученням тих структур, які відповідають за чутливість до гіпоксії. У цій фазі відмічаються зворотні процеси зниження до вихідного рівня швидкості фосфорилуючого і контрольованого дихання при одночасному відновленні, а іноді і зростанні дихального контролю і АДФ/О. Потік електронів у ЕТЛ МХ сповільнюється, але значно зростає ефективність використання кисню.

Встановлено, що ФАД-залежні субстрати (Ск) більш активно використовуються в першій фазі ПГ, ніж НАД-залежні субстрати (Гл і Пм). Внаслідок цього в гіпометаболічну фазу основне навантаження лягає саме на ІІ комплекс ЕТЛ МХ, що відповідає загальноприйнятій концепції [Лукьянова Л.Д., 2019]. При ПГ збільшується обсяг використання жирових субстратів як в гіпометаболічній, так і гіперметаболічній фазах.

Отримані результати узгоджувалися зі змінами експресії генів факторів транскрипції HIF-1 α і HIF-3 α . Якщо після перших сеансів ПГ відбувалося збільшення експресії мРНК HIF-1 α в обох шлуночках міокарда, то після 6 сеансу ці рівні не перевищували вихідні показники або навіть були зниженими у лівому шлуночку. Експресія мРНК HIF-3 α зростала в правому шлуночку в першій фазі ПГ, але не підвищувалася у відповідь на гіпоксію в кінці експерименту. Більш високі рівні експресії генів домінант-негативної субодиниці HIF-3 α в лівому шлуночку можуть обмежувати тканинне і метаболічне ремоделювання при ПГ, опосередковане HIF-1 α , особливо після досягнення фази метаболічної адаптації.

Отримані дані можуть підтверджувати зв'язок метаболічних змін в гіпометаболічній фазі з терміною індукцією генів після кожного сеансу гіпоксії. Однак після досягнення стабільної перебудови енергетичного метаболізму індукція факторів транскрипції після сеансу ПГ вже не відбувається.

Розвиток гіпометаболічного стану при іммобілізаційному стресі (ІС)

Вплив ІС на дихальну систему реалізується за рахунок кількох патогенетичних механізмів. Одним з ключових [Меерсон Ф.З, Пожаров В.П., 1993, 1994] є ушкодження сурфактанту в легенях внаслідок підвищеного виділення у кров перекисних сполук та метаболічного ацидозу тощо. Під впливом цих факторів порушується функція аерогематичного бар'єру, виникає гіпоксемія і спостерігається порушення біомеханічних властивостей легень за рахунок втрати еластичної тяги. Цей синдром був названий «стресорними легенями» і є однією з головних причин виникнення гіпоксії при стресі.

Вплив гострого ІС на паттерн дихання характеризувався значним зменшенням (на 62%) споживання кисню організмом і розвитком гіпометаболічного стану. Оскільки споживання кисню є ключовим показником, що відображує запит організму до систем доставки кисню, таких як зовнішнє дихання, то можна

очікувати закономірне зниження напруження роботи цих систем. Дійсно, при ІС вірогідно зменшувалися хвилинний об'єм дихання (\dot{V}_E) – більш ніж у 2 рази, частота дихання (f) – на 39% , при цьому вентиляційний еквівалент Антоні (VE) суттєво не змінювався, що свідчить про стеновентиляторну перебудову патерну дихання [Бреслав, 1982]. Ці зміни непрямо обумовлені, з одного боку, наявністю метаболічної інтоксикації в організмі, з другої сторони, центральним регуляторним впливом, який призводить до зменшення активності системи зовнішнього дихання внаслідок формування гіпометаболічного стану. Звертає на себе увагу зменшення показника кисневого ефекту дихального циклу на 60 %, що непрямо свідчить про порушення дифузійної властивості легень.

Для дослідження регуляторних механізмів вводили активатор K_{ATF} -каналів ПФ-5 одразу після ІС. Через 15 хв після введення спостерігалася суттєве підвищення хвилинної вентиляції легень за рахунок значного зростання (у 3 рази) глибини дихання і зниження частоти дихання, що супроводжувалося зростанням більше ніж у 2 рази швидкості споживання кисню. За рахунок цього вірогідно підвищувалася альвеолярна вентиляція і кисневий ефект дихального циклу, що непрямо свідчить і про зростання дифузійної властивості легень, тобто відбувалася оптимізація дихання.

Таким чином, активатор K_{ATF} -каналів практично повністю нормалізував паттерн дихання після ІС, причому зміни відбувалися за рахунок економізації дихання, можливо за рахунок зменшення гіпоксичної вазоконстрикції і компенсації «синдрому стресорних легень», завдяки цитопротективній дії цього активатора. Суттєва перебудова патерну дихання та газообміну була пов'язана перш за все зі значним поглибленням дихання і підвищенням споживання кисню. Ці дані дають можливість припустити, що при ІС мало місце пригнічення K_{ATF} -каналів і що це було патогенетичним чинником його розвитку.

Особливості розвитку ГМС при гострому ІС у тварин, адаптованих до гіпоксії. Встановлено, що після двотижневих інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ) вірогідно зростали показники дихання та газообміну відносно контрольної групи. Зростало споживання кисню на 25%, збільшувалося \dot{V}_E на 21% за рахунок поглиблення дихання на 23% та вираженої тенденції до зменшення частоти дихання, спостерігалася ізовентиляторна перебудова дихання [Бреслав, 1982]. Згідно з описаними нами фазовими змінами метаболізму, цю перебудову можна віднести до гіперметаболічної фази.

Після моделювання у тренуваних тварин гострого ІС було виявлено суттєве зменшення впливу стресорних чинників на їх організм. Слід зазначити, що загальні тенденції впливу ІС на патерн дихання спостерігалися і в цій групі: зменшення частоти дихання і \dot{V}_E , споживання кисню і кисневого ефекту дихального циклу. Однак інтенсивність цих змін при ГМС була значно меншою, ніж при стресі у нетренованих тварин: не спостерігалася зменшення дихального об'єму відносно контролю, був достовірно вищим вентиляційний еквівалент Антоні, який свідчить про високу економічність зовнішнього дихання.

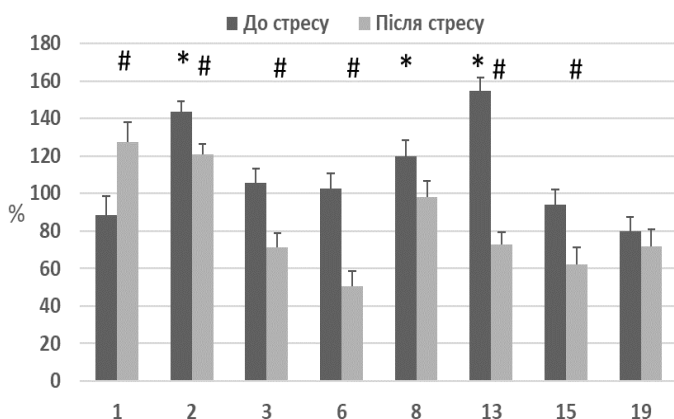
Таким чином, виявлено ефекти перехресної адаптації (до гіпоксії і стресу) на розвиток ГМС при гострій іммобілізації тварин.

При дослідженні мітохондріального дихання у тварин з ІС спостерігали зростання $\dot{V}O_2$ при окисненні Ск. Проте це не призводить до підвищення енергозабезпечення, оскільки ефективність фосфорилування вірогідно знижувалася в порівнянні з контрольними значеннями. Під час окиснення α -кетоглутарату зазначені негативні ефекти стресу супроводжуються інгібуванням функціонування мітохондрій. Так, для α -кетоглутарату встановлено зниження АДФ-стимульованого дихання (V_3) на 11%, дихального контролю (V_3/V_4) на 20%, ефективності використання кисню (АДФ/О) - на 13%. Отже, за умов стресу спостерігається більш істотне порушення системи окиснення НАД-залежних субстратів дихального ланцюга. НАД-залежний шлях надходження відповідних відновлених еквівалентів у ЕТЛ МХ пригнічується на фоні активації ФАД-залежного сукцинат-оксидазного шляху окиснення.

Одержані результати засвідчують, що за умов моделювання ІС у тварин після ПТ відбувається модуляція мітохондріального окиснення, спрямована на підтримку активності дихального ланцюга, його енергетичної функції. Зокрема це супроводжується вірогідним зниженням АДФ-стимульованого дихання, пов'язаного з окисненням сукцинату, та підвищенням спряження дихання з фосфорилуванням і збільшенням ефективності використання кисню для синтезу макроергів (АДФ/О) при окисненні α -кетоглутарату. Отже, ПТ викликає перебудову енергетичного обміну шляхом посилення НАД-залежного окиснення, яке перестає бути чутливим до низьких значень P_{O_2} , що виступає одним із механізмів підвищення резистентності дихального ланцюга мітохондрій до стресорних умов.

Особливості розвитку ГМС при хронічному ІС.

Вплив хронічного ІС на енергетичний обмін віддзеркалюють зміни швидкості



споживання кисню у спокої ($\dot{V}O_2$). Виходячи з одержаних даних, можна виділити декілька кардинальних змін енергетичного обміну при хронічному стресі (рис.9).

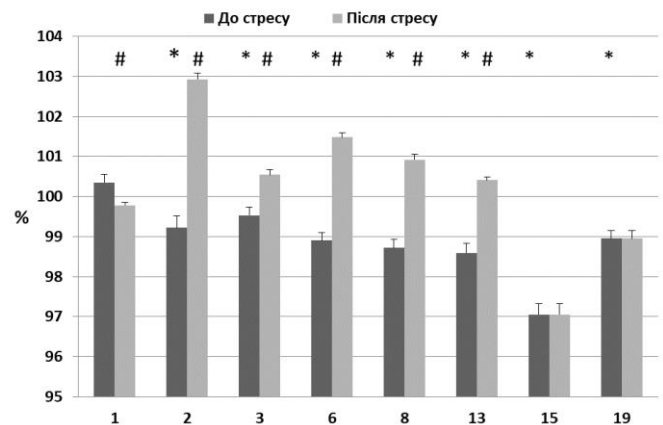
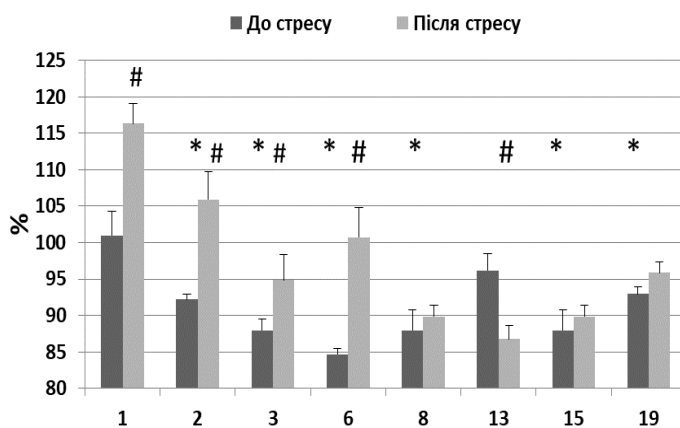
Рис. 9. Динаміка $\dot{V}O_2$ при моделюванні хронічного стресу. По осі ординат – номери сеансів ІС. * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем (100%), # $P < 0.05$ в порівнянні з показниками до кожного сеансу ІС.

Гостра реакція на стрес була пов'язана загалом зі зниженням ($\dot{V}O_2$), найнижче падіння відбувалося після 8 і 13 сеансів іммобілізації (на 52% і 79%, відповідно). Лише після першого сеансу іммобілізації (гострий стрес) $\dot{V}O_2$ вірогідно зростало, а після 19-го вірогідної реакції кисневого метаболізму у відповідь на стрес не спостерігалось (Рис. 9). Динаміка змін споживання кисню перед кожним сеансом ІС характеризувалася двома хвилями зростання $\dot{V}O_2$. Перша виникала через добу після 1 сеансу і закінчувалася на 3 добу. Друга, більш потужна, охоплювала 8-15 сеанси. Остання перебудова енергетичного обміну спостерігалася протягом 15-19 сеансів:

зниження споживання кисню до вихідного рівня і поступове нівелювання реакції \dot{V}_{O_2} на дію стресу.

Ректальна температура після першої іммобілізації знижувалася, як і споживання кисню (рис. 10). В подальшому перед сеансом T_T зменшувалася, а після іммобілізації спостерігалася гіпертермічна реакція на стрес. Після 15 сеансу температурна реакція на стрес не реєструвалася.

Рис. 10. Динаміка T_T при моделюванні хронічного стресу. * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем (100%), # $P < 0.05$ в порівнянні з показниками до кожного сеансу ІС.



Вміст глюкози у крові після 1-6-го сеансів ІС підвищувався (рис. 11). Однак вище контрольного рівня цей показник не зростав за рахунок гіпоглікемії, яка спостерігалася перед сеансами.

Рис. 11. Динаміка глікемії при моделюванні хронічного стресу. * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем (100%), # $P < 0.05$ в порівнянні з показниками до сеансу ІС.

З 8 по 13 сеанси відзначалося зростання рівня глюкози в крові перед сеансами, після сеансів концентрація глюкози в крові не змінюється, але після 13 сеансу мала місце вже гіпоглікемічна реакція. З 15 сеансу концентрація глюкози в крові стало знизилася, і реакції на іммобілізацію не було зареєстровано. Одержані дані дозволили вирізнити фазові зміни енергетичного обміну під час хронічного ІС, які в загальних рисах подібні фазам, які були виявлені нами при ПГ: гіпометаболічну (1-6 сеанси), перехідну (6-8 сеанси), гіперметаболічну (8-13 сеанси) і адаптаційну (13-19 сеанси). Проте були встановлені і суттєві відмінності, які проявлялися у менш виражених змінах споживання кисню у першій і третій фазах, гіпертермічній реакції на сеанс іммобілізації (за виключенням першого), тощо. Це може свідчити про менший вклад саме гіпоксичної компоненти в механізми змін енергетичного метаболізму при хронічному стресі.

Зміни об'ємно-часових показників дихання перш за все обумовлені змінами метаболізму, оскільки головним завданням системи дихання є здійснення процесів доставки кисню до тканин. Визначення патерну дихання перед кожним сеансом хронічного стресу показало його зв'язок з «хвилеподібним» характером змін енергетичного метаболізму. Через добу після 1 сеансу ІС хоча і не спостерігається зростання \dot{V}_E , проте має місце значне підвищення V_T і зниження f , що свідчить про ізовентиляторну перебудову патерну дихання – патерн «зростання» [Бреслав, 1982].

Перед 3-м сеансом ІС відбувається зворотня перебудова дихання, знижується V_T і підвищується f , розвивається так званий «гальмівний патерн». Зниження \dot{V}_{O_2} і відповідно до цього зниження параметрів дихання реєструються до 6 сеансу. Наступна хвиля змін дихання відбувається на 8-13 сеансах, відповідно до зростання \dot{V}_{O_2} спостерігається патерн «зростання», з поступовим поглибленням V_T і зменшенням f . Має місце також зростання \dot{V}_E , що свідчить про стеновентиляторну перебудову дихання. Перед 15 і 19 стресами був виявлений «гальмівний» патерн дихання. Зміни дихання одразу після сеансу ІС в різні часові проміжки мали наступні особливості. Після 1 і 8 сеансів, коли зростало споживання кисню (рис.9), спостерігалось вірогідне зростання \dot{V}_E . Після 1 сеансу відмічалось значне зростання \dot{V}_{O_2} , тому зростав V_T і знижувалася f . Після 8 сеансу спостерігалось незначне зростання V_T і f . У проміжок між 1 і 8 сеансами спостерігалось зниження вентиляції легень за рахунок вірогідного зниження V_T і зростання f . Всі перебудови дихання мали стеновентиляторний характер, лише після 3 сеансу спостерігалась ізовентиляторна перебудова дихання. Після 15 сеансу реакції дихання на стрес не було відмічено.

Реакція на стрес супроводжувалася зростанням як dV_I/dt , так і dV_E/dt , однак dV_I/dt було підвищеним до 6 сеансу ІС, а dV_E/dt – лише до 2 сеансу, що свідчить про домінування рестриктивного компонента опору дихання і підвищене навантаження на виконання роботи на вдиху при вентиляції легень. Це може вказувати на підвищену ригідність легеневої тканини, яка виникає при розвитку «стресорних легень». Зміни мітохондріального дихання були менш виражені, ніж при гострому ІС і при ПГ, однак виявлялася спільна динаміка відповідно до фазових змін енергетичного метаболізму. В першій фазі спостерігали тенденцію до зростання Ск-залежного шляху окиснення в мітохондріях. При цьому НАД-залежний шлях надходження відновлених еквівалентів у дихальний ланцюг пригнічувався і відбувалося зниження продукції АТФ, про що свідчить різке зниження V_3 на 18%, зменшення V_3/V_4 на 12 %, АДФ/О на 19,4 % і РДК на 11% відносно контролю. Це свідчить про зниження ефективності роботи мітохондрій, при якому, незважаючи на підтримання рівня споживання кисню організмом, суттєво знижується продукція АТФ у клітині, що і є основним механізмом розвитку гіпометаболічного стану. Зниження РДК, на тлі наведеного вище, є показником суттєвого зменшення резервної потужності роботи мітохондрій. В 3 і 4 фазах показники мітохондріального дихання наближались до рівня контрольних значень. Виключення становили показники V_3/V_4 , АДФ/О, РДК, які при окисненні НАД-залежних субстратів були підвищеними.

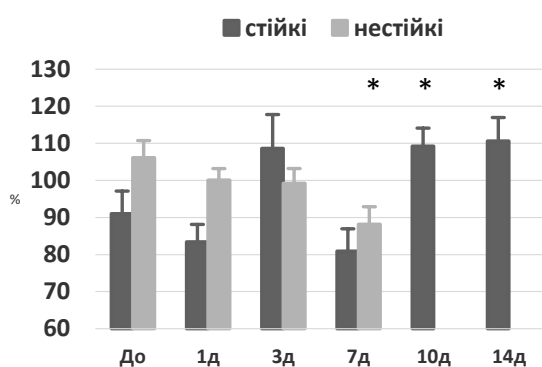
При моделюванні хронічного ІС після 1-го і 3-го сеансів спостерігається зростання рівня кортикостерону у крові на 15% і 25%, відповідно, порівняно з контролем. Після 7-го і особливо 14-го сеансів – вірогідне падіння вмісту кортикостерону у крові відносно контролю на 29% і 53%, відповідно. Після кожного сеансу ІС в початковій фазі спостерігається зростання T_t і гіперглікемія, що може бути пов'язано з викидом гормону. Як було нещодавно показано [Domokos G, 2019], глюкокортикоїди можуть знижувати продукцію активних форм кисню за рахунок роз'єднання окиснення і фосфорилування в мітохондріях, що призводить до

зниження виділення супероксид-аніону, але при цьому зменшується і синтез АТФ. Також відомо, що кортикостероїдні гормони можуть зменшувати активність комплексу I ЕТЛ МХ і мітохондріальних ферментів, при цьому знижується швидкість фосфорилуючого дихання V3 і зменшується ефективність використання кисню при окисненні різних субстратів. Однак при достатній кількості кисню це проявляється в характерному зростанні швидкості дихання без акцептора фосфату, ослабленні стимулюючої дії АДФ (зменшення або відсутність дихального контролю або перехід від 3 до 4 стану за Чансом), що може призводити до підвищення температури тіла. В підсумку тканина стає нечутливою до дії подразників великої інтенсивності, реакція на які могла б привести до її пошкодження [Лук'янова, 2019].

Таким чином, гіпометаболічний стан виникає і при високому рівні загального споживання кисню за рахунок набряку мітохондрій і роз'єднання окиснення з фосфорилуванням під дією кортикостероїдних гормонів.

Зміни патерну дихання і кисеньзалежної частини енергетичного метаболізму при моделюванні первинної гіпоксії.

Зміни в функціонуванні тканин при тривалому введенні ротенону, який прямо пригнічує роботу I комплексу ЕТЛ мітохондрій, можна розглядати в аспекті поглядів на «біоенергетичну гіпоксію» як складного багатофазового процесу при різних формах кисневої недостатності, в основі якого лежать послідовні зміни властивостей мітохондріальних ферментних комплексів та їх енергосинтезуючих функцій [Лук'янова, 1997]. Таке припущення об'єднує різні мітохондріальні захворювання і порушення при гострих гіпоксичних впливах, які виявляються на рівні I комплексу ЕТЛ МХ [Колесникова, 2010]. При тривалому введенні ротенону у щурів спостерігали 60% летальність. У групі тварин, стійких до дії ротенону,



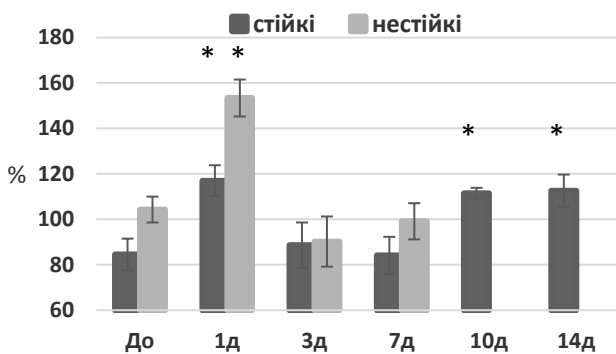
визначалася наступна динаміка змін \dot{V}_{O_2} (рис. 12) – зростання на 3 добу, суттєве зниження на 7 добу, зростання і стабілізація на 10-14 добу. У групі нестійких до ротенону щурів \dot{V}_{O_2} знижувалося до 7 доби досліджень, коли більшість цих тварин загинула.

Рис. 12. Динаміка змін \dot{V}_{O_2} у щурів при тривалому введенні ротенону. * $P < 0.05$ в порівнянні з початковим рівнем.

В обох групах тварин спостерігаються фазові зміни енергетичного метаболізму. Перша фаза тривала до 7-ї доби в обох групах, проте, якщо у групі стійких тварин спостерігалася переключення (2-га фаза), і починалася 3-тя фаза, то нестійкі тварини гинули у 2-й фазі змін метаболізму. Зміни патерну дихання через добу після введення ротенону в обох груп тварин характеризувалися деяким зростанням \dot{V}_E ($P < 0.05$), переважно за рахунок збільшення V_T ($P < 0.05$). На 3 добу введення ротенону у нестійких тварин спостерігалася зниження V_T ($P < 0.05$) і незмінний рівень f , \dot{V}_E знижувався ($P < 0.05$). Це свідчить про стеновентиляторну перебудову патерну дихання і наявність «хімічного» впливу на дихальний центр [Бреслав, 1980]. Окрім

цього, системне введення ротенону, очевидно, діє на рівні периферичних хеморецепторів каротидного гломусу (КГ). Враховуючи полімодальність КГ, на рівні якого потенційну медіаторну активність проявляє досить велика кількість агентів, потрібно також мати на увазі можливу дію ротенону на хеморецепторні клітини I типу і відповідну зміну аферентного сигналу з КГ до NTS. Так, P2X3-дефіцитні тварини демонструють суттєве зниження аферентної активності синокаротидного нерву при нормоксії [Rong et al. 2003], що вказує на зв'язок інтенсивності продукції макроергів (АТФ), медіаторний ефект яких реалізується за допомогою пуринергічних рецепторів, з синаптичною передачею і активністю КГ. Окрім цього, можна очікувати, що хімічна десенситизація/оклюзія КГ викликає відповідь у стовбурових структурах дихального центру, а саме модифікує рівень функціонування глутамат/ГАМК-ергічного апарату, що може сприяти перебудові патерну дихання. У стійких тварин на 3 добу після введення ротенону на тлі зростання споживання кисню спостерігалася ізовентиляторна перебудова дихання, значно зростав V_T ($P < 0,05$), і знижувалася частота дихання f ($P < 0,05$), за рахунок чого \dot{V}_E вірогідно не змінювався. На сьомий день спостерігалася зворотна ізовентиляторна перебудова дихання, проте \dot{V}_E знижувався, за рахунок зниження V_T і зростання f . В подальші терміни дослідження \dot{V}_E і V_T залишалися незмінними, а частота дихання підвищеною.

Про дію ротенону на біомеханіку дихання свідчать показники $d\dot{V}/dt$ на вдиху (рис.13), які показують прискорення дихального потоку і свідчать про зусилля, яке робить дихальна мускулатура для вдиху повітря. Найбільше зростання цього



показника спостерігається через добу в обох групах, на 3 добу $d\dot{V}/dt$ на вдиху знижується. У стійкої групи це свідчить про зменшення навантаження на акт вдиху, внаслідок чого зростає дихальний об'єм. У нестійких щурів, навпаки, зменшення дихального об'єму.

Рис.13. Динаміка змін $d\dot{V}/dt$ на вдиху у щурів при хронічному введенні ротенону. * $P < 0,05$ в порівнянні з початковим рівнем

З динаміки змін $d\dot{V}/dt$ на вдиху можна припустити, що у нестійкій групі тварин виникає втома дихальних м'язів внаслідок зростання біомеханічного опору у легенях і зменшення ефективності роботи дихальних м'язів. Після зсуву енергетичного метаболізму у другій фазі значно зростає навантаження на систему доставки кисню, яка неспроможна забезпечити киснем метаболічні потреби організму, що призводить до загибелі тварин. Таким чином, характерною рисою первинної гіпоксії є наявність фазових змін перебудови енергетичного метаболізму. Виходячи з одержаних даних, можна зробити висновок, що друга і третя фази настають автоматично, незважаючи на обмежені можливості системи транспорту кисню, що може призводити до загибелі. Цей механізм може слугувати також поясненням різкого погіршення стану хворих на COVID-19-викликану пневмонію на 9-10 день захворювання.

Особливості розвитку гіпометаболічного стану при респіраторній гіпоксії та можливості його фармакологічної корекції.

Встановлено, що при ЛПС-індукованій пневмонії у щурів через добу спостерігалось зниження енергетичного обміну, про що свідчить поступове падіння споживання кисню ($P < 0,05$). При введенні наночастинок церію інтактним тваринам \dot{V}_{O_2} зростає через 1-3 год і нормалізується через добу. При корекції експериментальної пневмонії церієм спостерігали сумачію цих ефектів, внаслідок чого вираженого падіння споживання кисню через добу не відбувалося.

Вентиляція легень при моделюванні пневмонії знижується, з мінімумом через добу ($P < 0,05$). При вживанні церію вентиляція легень зростає, найбільш виражено через 3 год. При моделюванні пневмонії знижуються також V_T і f , що свідчить про стеновентиляторну перебудову патерну дихання внаслідок «хімічних» або токсичних впливів, але при застосуванні церію спостерігається ізовентиляторна перебудова патерну дихання, що може свідчити про значне зниження цих токсичних впливів.

Динаміка кисневого ефекту дихального циклу відображує дифузійну властивість легень для кисню і, за нашими спостереженнями, корелює з морфологічними змінами у легенях щурів при запаленні. Цей показник порушується при пневмонії, підвищується при введенні церію інтактним щурам і знижується при лікуванні пневмонії церієм, але вираженого падіння споживання кисню не відмічається, що вказує на менший об'єм ураження легень при лікуванні церієм. Інтегральний показник доставки кисню в альвеоли легень, що характеризує роботу вентиляторного апарату легень по транспорту кисню до альвеол, значно знижується при пневмонії, але при введенні церію відновлюється активна доставка кисню, яка забезпечує метаболічні потреби організму. Морфологічні зміни у легенях повністю співпадають з функціональними змінами дихання.

Таким чином, респіраторна гіпоксія характеризується наявністю гіпометаболічної фази зі зниженням \dot{V}_{O_2} і стеновентиляторною перебудовою патерну дихання. Введення препарату наночастинок церію суттєво зменшує прояви цього стану, що надає перспективи для його клінічного застосування.

Вплив хронічної гіпоксії (ХГ) на організм експериментальних тварин у середньогір'ї.

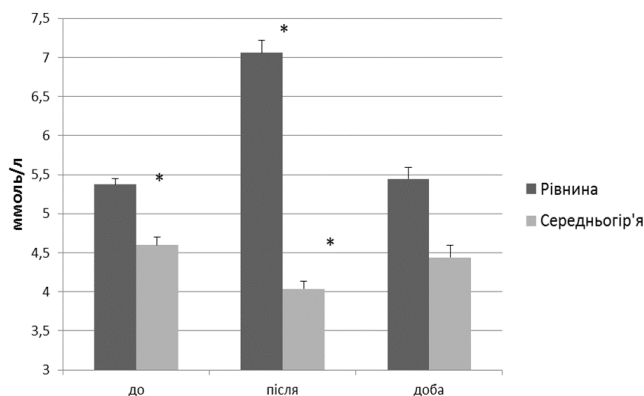
При впливі умов середньогір'я (2100 м н.р.м.) на неадаптованих щурів Вістар встановлено, що на 1 добу перебування на висоті у тварин значно зросла \dot{V}_{O_2} ($P < 0,05$), проте на 30 добу цей показник значно зменшився і практично не відрізнявся від споживання кисню тваринами на рівнині. При дослідженні паттерну дихання виявлено, що \dot{V}_E на початку адаптації до середньогір'я зростає більш ніж в 2 рази, а на 30 добу зменшується практично до рівня на рівнині, f практично не змінюється, але в усі терміни адаптації вона вище, ніж на рівнині. V_T на перший день перебування в горах зростає, але на 30 день вже не відрізняється від V_T на рівнині. Спостерігається зменшення \dot{V}_A/\dot{V}_E на 30 день адаптації, до рівня як і у щурів, вирощених в умовах середньогір'я «аборигенів» (2100 м). В обох групах спостерігається гіпервентиляція легень внаслідок високої частоти дихання, зі зниженням парціального тиску в альвеолах P_{ACO_2} і зростанням P_{AO_2} . На 1 добу

перебування у горах у щурів виявлявся синдром гіповентиляції легень, а саме зниження парціального тиску O_2 в альвеолах і зростання парціального тиску CO_2 . Характерною особливістю щурів-аборигенів було більш значне зниження споживання кисню у спокої, що може свідчити про високий рівень адаптації їх тканин до високогірної гіпоксії. При цьому спостерігалася гіпервентиляція легень, зниження співвідношення \dot{V}_A/\dot{V}_E , за рахунок як підвищення частоти дихання, так і зменшення \dot{V}_A . Всі ці зміни є проявом «холостої роботи» легень у цих тварин у стані спокою і є атрибуту гіпометаболічного стану адаптованого організму.

Таким чином, на початку адаптації до ХГ спостерігається стресорна симпатична реакція зі зростанням споживання кисню, що характеризується розвитком гіповентиляції легень, респіраторною гіпоксією, основною причиною якої може бути гіпоксична вазоконстрикція легень. При 30-денній адаптації тварин ці показники нормалізуються і суттєво не відрізняються від показників на рівнині.

При дослідженні тривало адаптованих щурів (3-річна популяція) встановлено зниження у них швидкості споживання кисню (\dot{V}_{O_2}) порівняно з неадаптованими тваринами ($p < 0,05$). Після сеансу ГГ \dot{V}_{O_2} значно знижувалася ($P < 0,05$), а через добу нормалізувалася як у неадаптованих, так і у тривало адаптованих щурів, причому різниця між цими групами нівелювалася.

Вміст глюкози в крові неадаптованих тварин відразу після сеансу ГГ значно зростає, а через добу знижувався до вихідного рівня (рис. 14). У тривало



адаптованих тварин показники були вірогідно меншими, після сеансу ГГ гіпоглікемія поглиблювалася, а через добу показники відновлювалися до вихідного рівня.

Рис. 14. Зміни вмісту глюкози в крові щурів після ГГ на рівнині і в середньогір'ї.

* $P < 0,05$ в порівнянні з рівнинною групою до впливу ГГ.

Визначені нами показники стану системи мітохондріального енергозабезпечення свідчать, що у тварин, тривало адаптованих до середньогір'я, спостерігалися вірогідні зміни в основному щодо утилізації НАД-залежних субстратів мітохондріями, а саме зростало співвідношення V_3/V_4 за рахунок більш високого рівня V_3 у цих тварин. Після ГГ зміни показників АДФ-стимульованого дихання (V_3) та дихального контролю (V_3/V_4) в разі окиснення ФАД-залежного субстрату Ск не відрізнялися у тварин, вирощених на рівнині та у середньогір'ї. Натомість окиснення НАД-залежних субстратів дихального ланцюга у адаптованих щурів, на відміну від неадаптованих, супроводжувалося збільшенням V_3 та V_3/V_4 . Звертає на себе увагу той факт, що за умов ГГ у тривало адаптованих тварин при окисненні Гм і Пм відбувається вірогідне зростання РДК.

Таким чином, внаслідок тривалої адаптації до гіпоксії у щурів відзначається гіпоглікемія та енергетичний гіпометаболізм у стані спокою, що може бути наслідком зростання утилізації глюкози тканинами при загальному обмеженні

киснезалежних метаболічних процесів. Вплив ГГ викликає у цих тварин поглиблення гіпометаболічного стану, яке розвивається все ж меншою мірою, ніж на рівнині, а також посилення гіпоглікемії. Це вказує на відсутність стресорної реакції і розвитку гострої інсулінорезистентності у цих тварин у відповідь на ГГ, внаслідок чого вуглеводні субстрати можуть інтенсивно використовуватися для енергозабезпечення тканин, а також на підвищену стійкість ферментів комплексу 1 ЕТЛ МХ до нестачі кисню. Одержані результати можуть свідчити про використання мітохондріями печінки адаптованих тварин окиснення ліпідів як резерву, який може слугувати для оптимізації напруженого енергетичного обміну в організмі при поглибленні гіпоксії.

Після 6 сеансів ПГ у тривало адаптованих щурів спостерігалось суттєве підвищення газообміну і повна редукція гіпометаболічного стану з підвищенням окиснення як НАД- так і ФАД-залежних субстратів субстратів. Ці зміни супроводжувалися модуляцією чутливості субодиниць фактора HIF до досліджуваних режимів гіпоксії. У щурів як після ГГ, так і при ПГ не спостерігалось посилення синтезу білка HIF-1 α в тканинах. Ці результати вказують на те, що субодиниця транскрипційного фактора HIF1 α має зменшену чутливість до нестачі кисню у високогірних тварин. Натомість спостерігали більш виразні зміни експресії мРНК HIF-3 α . У тривало адаптованих щурів зростала експресія мРНК HIF-3 α – найбільш виразно у лівому шлуночку серця, дещо менше – у правому, ще менше – в легенях. ГГ вірогідно не впливала на ці показники. ПГ пригнічувала експресію мРНК HIF-3 α , більшою мірою в серці. Таким чином, саме субодиниця HIF-3 α може грати роль кисневого сенсора у міокарді та легенях тварин, які адаптовані до гіпоксичних умов, і може бути промотором розвитку гіпометаболічного стану.

Експресія білка iNOS зростала після ГГ та знижувалася при ПГ відповідно до змін експресії мРНК HIF3 α . Отже, HIF3 α може відігравати центральну роль в регуляції кисневої чутливості тканин у тварин-аборигенів високогір'я, а iNOS – в регуляції функції системи дихання при впливі високогірної гіпоксії.

Таким чином, постійне перебування щурів на висоті 2100 м н.р.м. супроводжувалося розвитком гіпометаболічного стану, який проявлявся як на рівні цілісного організму, так і на субклітинному рівні (мітохондріальне дихання). Головною причиною розвитку цього стану є перехід роботи мітохондрій на більш економічний, але менш продуктивний функціональний рівень. Одним з можливих ключових механізмів розвитку гіпометаболічного стану може бути постійна індукція субодиниці транскрипційного фактора HIF3 α , а також індукція iNOS, яка викликає зниження метаболічних процесів у мітохондріях і обмеження споживання кисню тканинами через продукцію NO. Після ГГ прояви гіпометаболізму поглиблювалися. Натомість сеанси ПГ редукували гіпометаболічний стан, при цьому спостерігалось зменшення індукції HIF3 α і iNOS та посилення регенераторних процесів у тканинах. Таким чином, різні режими гіпоксії надають можливість через включення різних молекулярних механізмів впливати на процес адаптації до високогірної гіпоксії.

У тривало адаптованих щурів виявлено зниження вмісту глюкози в крові на $15,6 \pm 2,3\%$ ($P < 0,05$ у порівнянні з неадаптованими щурами). Через добу після дії ГГ

спостерігали поглиблення гіпоглікемії на $13,6 \pm 3,4\%$ ($P < 0,05$), протягом 5 діб експерименту показники глікемії поступово поновлювалися до вихідного рівня. Це супроводжувалося зростанням експресії гену транспортера глюкози GLUT-1 у шлуночках серця, що вказує на зростання базального рівня поглинання глюкози клітинами. В той же час адаптація до ХГ не впливала на експресію гену GLUT-4. Після впливу ГГ реакція генів-мішеней HIF1 α мала інший характер: експресія гену GLUT-1 вірогідно не змінювалася протягом експерименту, тоді як рівень мРНК GLUT-4 зростав через 3-5 діб після впливу гіпоксії у серці щурів ($P < 0,05$) і мав тенденцію до збільшення у легенях. Одержані результати можуть свідчити про те, що ГГ активує переважно інсулінозалежні шляхи вуглеводного обміну, а при тривалій адаптації до гіпоксії ці механізми обмежуються, при цьому посилений метаболізм глюкози забезпечується через індукцію GLUT-1.

Головною причиною розвитку гіпоглікемії при впливі гіпоксії, на нашу думку, є активація гліколізу. Гліколіз продукує в 19 разів менше АТФ з 1 молекули глюкози, ніж аеробний шлях окиснення [Lehninger, 2009], тим не менше, він може забезпечити енергією клітину при нестачі кисню за умов достатнього надходження глюкози у клітину, оскільки гліколітичні реакції синтезу АТФ мають високу швидкість з більш низьким значенням K_m , і гальмуються лише нестачею субстрату – глюкози. Наші дані вказують, що за умов гіпоксії в клітині спостерігається зростання інсулінонезалежного транспорту глюкози в клітину GLUT1. Продукція глюкози печінкою в гіпоксичних умовах не може повністю забезпечувати підвищене споживання глюкози клітинами організму, внаслідок чого і розвивається гіпоглікемія. Цей ефект вперше був встановлений О. Warburg [1924] на клітинах пухлин, які продукують АТФ шляхом гліколізу. На відміну від цього, гліколіз при гіпоксії є контрольованою зміною метаболізму, яка досить жорстко лімітується. Але активація комплексу зазначених механізмів, на нашу думку, лежить в основі сприятливого впливу гіпоксії на гомеостаз глюкози у хворих на діабет.

Метаболічна перебудова в динаміці впливу хронічної гіпоксії на здорових добровольців і осіб з порушеннями метаболізму та її механізми

При перебуванні у середньогір'ї (2100 м) у жінок і чоловіків-мешканців рівнини відбувалися характерні метаболічні зміни. У чоловіків рівень загального холестерину та його фракцій (холестерину ліпопротеїдів високої щільності – ЛПВЩ і низької щільності – ЛПНЩ) у периферичній крові прогресивно знижувався протягом гіпо- і гіперметаболічної фаз адаптації. Після повернення на рівнину співвідношення фракцій холестерину змінювалося сприятливим чином, внаслідок чого коефіцієнт атерогенності був значно зниженим протягом 1 місяця досліджень. Особливо істотним було зниження показників холестерину ЛПНЩ, що є позитивним чинником впливу високогірного клімату. Зниження рівня холестерину ЛПВЩ можна вважати фактором ризику, але воно було відносно меншим, а в періоді деадаптації показники швидко зростали понад вихідний рівень. В цілому вплив ХГ на метаболізм холестерину можна вважати протекторним як у періоді адаптації, так і протягом тривалого періоду деадаптації на рівнині.

При порівнянні показників чоловіків-мешканців рівнини і горців можна відзначити, що 3-тижнева адаптація призводила до практично повної ідентичності показників у цих групах. У жінок серед фракцій холестерину більшою мірою знижувався холестерин ЛПВЩ, що призводило до деякого зростання у них коефіцієнту атерогенності, незважаючи на загальне зменшення показників всіх фракцій холестерину. У жінок-аборигенів рівень холестерину ЛПНЩ і коефіцієнт атерогенності були вірогідно нижчими, а співвідношення фракцій холестерину – більш сприятливим, ніж у мешканок рівнини через 3 тижні перебування в горах.

Характеризуючи фази метаболічної перебудови, можна виділити відмінності ліпідного обміну. В гіпометаболічну фазу (до 1 тижня ХГ) відбувається зниження рівнів холестерину і його фракцій та тригліцеридів у плазмі крові. Ці зміни можуть бути наслідком загального зниження метаболізму на початок адаптації. Гіперметаболічна фаза відрізняється зростанням рівня тригліцеридів на тлі подальшого зниження рівнів холестерину і його фракцій, менш виразні зміни відбуваються у жінок.

ХГ у середньогір'ї позитивно впливала на вуглеводний обмін у досліджуваних жителів рівнини. Показники ТТГ в динаміці спостереження сприятливо змінювалися як у здорових добровольців, так і у хворих з порушеннями вуглеводного метаболізму. У здорових осіб перебування в середньогір'ї не викликало вірогідних змін показників ТТГ, проте у гіпо- та гіперметаболічній фазах перебудови спостерігали чітку тенденцію до зменшення гіперглікемічної реакції через 60 хв після вживання глюкози, в середньому на 1 і 1,7 ммоль/л, відповідно. Після повернення на рівнину показники відновлювалися. У хворих осіб динаміка показників була іншою. При порушенні параметрів ТТГ в гіперглікемічній та постглікемічній фазі перебування в горах прогресивно зменшувало обидва патологічно змінені показники. Повернення на рівнину характеризувалося уповільненням постглікемічної фази ТТГ, однак через 6 тижнів деадаптації швидкість утилізації глюкози вірогідно відновлювалася. У випадку порушень утилізації глюкози перебування в середньогір'ї спричинювало тенденцію до нормалізації цих процесів вже в гіпометаболічній фазі, при подальшій адаптації показники вірогідно не змінювалися. Це відповідало переходу тканин на вживання ліпідних субстратів для енергетичних потреб. В періоді деадаптації відбувалося вірогідне покращення утилізації глюкози з нормалізацією кривої ТТГ через 6 тижнів.

Таким чином, при адаптації до умов середньогір'я завдяки послідовним фазам активації вуглеводного і ліпідного обміну і змінам експресії відповідних генів і білків, які забезпечують енергетичні та пластичні потреби клітин і органів, відбувається покращення регуляції вуглеводного обміну і нормалізація порушень толерантності до глюкози. Можна відзначити характерні загальні зміни толерантності до глюкози у здорових осіб та хворих з помірними порушеннями вуглеводного метаболізму: поступове зниження гіперглікемічної реакції на вживання глюкози протягом адаптації, покращення порушеної утилізації глюкози в гіперметаболічній фазі адаптації, нормалізація глікемічної реакції і уповільнення утилізації глюкози в періоді неповної деадаптації, нормалізація рівня глікемії натще і порушень толерантності до глюкози в періоді повної деадаптації.

Наявність метаболічних порушень може складним чином впливати на причинно-наслідковий зв'язок метаболічної регуляції та адаптивно-деадаптивних процесів. Виявлено, що адаптація до умов середньогір'я у здорових добровольців призводить до прогресивного зниження експресії білка IGF-1. Хворі з метаболічними розладами (цукровий діабет 1 і 2 типу, метаболічний синдром) – мешканці рівнини характеризувалися значною редукцією експресії цього білка порівняно з відповідними групами здорових ($P < 0,05$). Однак для горців не було виявлено залежності рівня експресії IGF-1 та метаболічних розладів. Таким чином, у жителів рівнини розлади метаболізму, зокрема вуглеводного, можуть бути асоційовані з нестачею індукції інсуліноподібних метаболічних регуляторів, тоді як за умов тривалого гіпоксичного впливу розвиток метаболічних порушень пов'язаний з виключенням цієї регуляторної ланки з компенсаторних механізмів.

При дослідженні експресії лептину не виявлено вірогідних змін між неадаптованими та адаптованими здоровими особами, хоча мешканці середньогір'я мали дещо зменшений рівень експресії цього білка. Однак для хворих з метаболічними розладами характерним був редукований рівень лептину у неадаптованих осіб ($P < 0,05$). З огляду на здатність лептину компенсувати розлади вуглеводного метаболізму, це дозволяє зробити висновок про розвиток метаболічних порушень за гіпоксичних умов лише в осіб з порушеною чутливістю до лептину, тоді як у неадаптованих людей основним патогенетичним чинником може бути нестача експресії лептину.

Вплив інтервальної гіпоксії на здорових і хворих з метаболічними порушеннями та його механізми .

При дослідженні впливу 9 сеансів переривчастої інтервальної гіпоксії (ІГТ) на здорових добровольців (група 1) та хворих з метаболічним синдромом і предіабетом (група 2) на базі клініки ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМНУ» виявлено, що вихідні показники глікемії натще були підвищеними у групі з предіабетом на 18%, показники ТТГ були підвищеними через 2 год в 1,4 рази, а показники інсулінемії – у 4,7 рази ($p < 0,05$). Після завершення курсу ІГТ показники глікемії натще у хворих нормалізувалися, а показники ТТГ зменшилися на 11% і продовжували нормалізуватися через 1 місяць після гіпокситерапії. Меншою мірою на ІГТ реагували показники інсулінемії.

Одержані результати вказують на універсальність ефектів і механізмів метаболічного пристосування до гіпоксії, незважаючи на наявність помірних метаболічних розладів, що обґрунтовує можливість використання гіпокситерапевтичних підходів для корекції метаболічних порушень.

Встановлено молекулярно-генетичні механізми впливу ІГТ на здорових і хворих осіб. Показано, що в гіпометаболічній фазі впливу ІГТ (1 тиждень, 3 сеанси) як у здорових, так і у хворих осіб значно індукувалася експресія мРНК HIF-1 α . В гіперметаболічну фазу у здорових осіб експресія мРНК HIF-1 α нормалізувалася, однак у хворих продовжувала зростати і лише частково редукувалася через 1 місяць після впливу ІГТ. Важливо, що вихідний рівень експресії мРНК HIF-1 α не корелював з глікемією натще у досліджуваних осіб, проте така асоціація зростала протягом впливу ІГТ у хворих з метаболічними порушеннями. Таким чином, зміни

вуглеводного метаболізму у хворих були помірно пов'язані з більш тривалою у них індукцією HIF-1 α . Показано кореляційний зв'язок між експресією мРНК HIF-1 α і SaO₂.

Однак, незважаючи на значну індукцію HIF-1 α у здорових і хворих з метаболічними порушеннями вже у гіпометаболічній фазі, відповіді його генів-мішеней на цю індукцію HIF-1 α були неоднаковими. Так, експресія інсулінового рецептора INSR та регулятора гліколізу PDK1 у здорових осіб також зростала або мала тенденцію до зростання в цьому періоді, тоді як експресія генів транспортерів глюкози SLC2 і субодиниць K_{ATP}-каналів KCNJ8 виразно зростала лише в гіперметаболічній фазі перебудови. У хворих (порівняно із здоровими) зростання експресії SLC2 було меншим, а PDK1, INSR і KCNJ8 – відстроченим з максимумом через 1 місяць після впливу ($P < 0,05$). Таким чином, більш тривала транскрипційна активація HIF-1 α у хворих осіб призводила (і була необхідною) для поступового відновлення експресії генів-регуляторів вуглеводного метаболізму, зокрема, INSR та KCNJ8, та регулятора енергетичного метаболізму PDK1. Одержані результати відповідають даним щодо більш тривалого збереження підвищеного рівня інсулінемії у групі хворих осіб, незважаючи на досягнуту нормалізацію глікемії, оскільки регулятори синтезу та рецепції інсуліну KCNJ8 і INSR демонстрували відстрочену реакцію на ІГТ.

Одержані результати дозволяють надати рекомендації щодо застосування розроблених гіпоксичних режимів для таргетного впливу на гени-метаболічні регулятори, а також попередження і лікування розладів вуглеводного і ліпідного обміну у пацієнтів за допомогою впливу високогірної, періодичної гіпоксії та комбінованих гіпоксичних режимів.

Гіпометаболізм – необхідна умова стабілізації кисневих режимів організму при гіпоксії (математичне моделювання)

Розроблено математичну модель, в якій системи дихання та кровообігу розглядаються як керована динамічна система, що описується диференціальними рівняннями щодо напруження респіраторних газів (O₂, CO₂ та N₂) при транспорті та масообміні газів в структурах організму – дихальних шляхах, альвеолярному просторі, крові легеневої та тканинних капілярів, в артеріальній та змішаній венозній крові, в рідинах органів і тканин. Керування системою здійснюється органами дихання, серцем та гладенькими м'язами судин, збурення яких імітується зміною зовнішніх (барометричний тиск, склад дихальної суміші) та внутрішніх (окремі патології, які впливають на систему транспорту кисню, швидкість утилізації кисню при окислювальних процесах тощо) умов. Одержані результати комп'ютерного аналізу математичної моделі свідчать, що гіпометаболізм – один із потужних і необхідних для виживання механізмів регуляції функціонального стану організму при високогірній гіпоксії. Зокрема, при тяжкій гіпоксії (еквівалентній 4%-6% O₂ в дихальній суміші) доставка кисню до тканин критично знизиться і розрахункові показники pO₂ в тканинах можуть перейти до від'ємних. Механізми регуляції системи дихання та кровообігу зменшать величини альвеолярної вентиляції та об'ємної швидкості системного кровотоку, відповідно до величин

q_{li} , $i = \overline{1, m}$, і відбудеться перерозподіл системного кровотоку серед органів та тканинних резервуарів. Таким чином, математичне моделювання доводить необхідність виникнення гіпометаболічного стану на моделі тяжкої гіпоксії, оскільки за його відсутності, при збереженні звичайного режиму масопереносу кисню до тканин, визначатимуться від'ємні величини pO_2 в тканинах і дестабілізація системи дихання.

Аналіз результатів наших досліджень вказує, що основною реакцією на вплив різних видів гіпоксії є розвиток гіпометаболічного стану, пов'язаного з порушенням синтезу АТФ в клітинах. Встановлено, що ключову роль у його розвитку відіграє стабілізація факторів транскрипції HIF-1 α і HIF-3 α , які стимулюють активацію захисних і адаптивних генів. Активуються стійкі до гіпоксії білки аеробної частини енергетичного обміну і гліколіз. Також внаслідок дії гіпоксії спостерігається мітохондріальна дисфункція, порушення роботи комплексу 1, зниження окиснення НАД-залежних і домінування окиснення ФАД- залежних субстратів, розвиток окисного стресу та гіперглікемічної реакції. Внаслідок роз'єднання окиснення і фосфорилування підвищується температура тіла. Комплексні зміни метаболічних параметрів вказують на спільні риси стрес-реактивних механізмів та відповіді на гіпоксію різного генезу.

Нашими дослідженнями показано, що гіпометаболічний стан є тривалішим, ніж це вважали раніше, і становить основу гіпометаболічної фази, яка триває 5-9 діб, в залежності від глибини і тривалості гіпоксичного стимулу. Після перехідної фази, яка перемикає знижений енергетичний рівень функціонування клітин на підвищений енергетичний рівень, відбувається зміна реакції на гіпоксію, і замість падіння споживання кисню після чергового сеансу гіпоксії спостерігається його зростання, що визначається як гіперметаболічна фаза. Гіперметаболічна фаза характеризується значним зростанням енергетичного метаболізму, яке опосередковується обмеженням функції HIF-1 α (рис.15). При цьому відмічається зростання спряження окиснення з фосфорилуванням, відновлення функціонування комплексу 1 ЕТЛ МХ, домінування окиснення НАД-залежних субстратів над ФАД-залежними, зростання продукції АТФ, зниження температури тіла, гіпоглікемія. Відповідно зростанню споживання кисню зростає функція зовнішнього дихання. Приблизно через 16-18 днів розвивається адаптивна фаза, коли нормалізуються функціональні показники організму і встановлюється новий стан енергетичного обміну організму, при якому реакція на гіпоксичний, або стресорний стимул мінімізується.

Важливим результатом є встановлення факту, що на зміну фаз не впливає рівень готовності кисеньтранспортної системи до підвищення метаболічних потреб тканин. Як показує моделювання первинної тканинної гіпоксії, це може приводити до загибелі організму внаслідок невідповідності можливостей системи транспорту кисню до тканин до кисневого запиту, що зростає.



Рис. 15. Схема фазових змін метаболізму при гіпоксії різного генезу та їх механізмів.

Одержані результати можуть надати також пояснення значного погіршення перебігу COVID-19-індукованої пневмонії, асоційованого з розвитком гіперметаболічної фази на 9-10 добу респіраторної гіпоксії.

Розроблені методи корекції та теоретичні висновки дозволяють рекомендувати призначення глюкокортикоїдних гормонів як складових патогенетичної терапії, що дозволяє відтермінувати настання гіперметаболічної фази, а також лікування наночастинками церію для корекції порушень у гіпометаболічній фазі.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі на підставі результатів фізіологічних, біохімічних, молекулярно-генетичних досліджень охарактеризовано фазові зміни метаболізму і розвиток гіпометаболічного стану при гіпоксії різного генезу, встановлено механізми їх розвитку, представлено підходи до патогенетичної корекції гіпоксичних та метаболічних розладів.

1. Встановлено, що при дії гострої гіпоксії розвивається гіпометаболічний стан, який супроводжується зниженням енергетичного обміну, газообміну, зовнішнього і мітохондріального дихання внаслідок зменшення швидкості дихання мітохондрій, пригнічення окисного фосфорилування, переважного використання ФАД-залежних субстратів для синтезу АТФ. Знижується ефективність фосфорилування та використання кисню в мітохондріях. Внаслідок розвитку мітохондріальної дисфункції спостерігається окисний стрес та активація антиоксидантного захисту, в тому числі, за рахунок індукції MnSOD.

2. Після початку дії гіпоксії зміни газообміну мають фазовий характер: перша фаза – гіпометаболічна, яка триває 5-10 діб в залежності від важкості і тривалості гіпоксичного стимулу, характеризується зниженням енергетичного обміну, зниженням споживання кисню, підвищеною чутливістю до повторного впливу гіпоксії; друга фаза – перехідна, відрізняється переключенням метаболічних процесів в бік зростання; третя фаза – гіперметаболічна, характеризується ростом енергетичного метаболізму, окисного фосфорилування, переважним окисненням НАД-залежних субстратів, в тому числі, ліпідних, чутливість до гіпоксії зменшується; четверта фаза – адаптивна, настає приблизно на 16-18 день, характеризується встановленням енергетичного обміну на новому рівні, виникає толерантність до дії гіпоксичного впливу.

3. Фазові зміни енергетичного метаболізму притаманні різним видам гіпоксії: гострій, періодичній, хронічній (високогірній), гіпоксії при стресі, первинній тканинній, респіраторній гіпоксії тощо. Фазові зміни енергетичного метаболізму при різних видах гіпоксії мають особливості, пов'язані з важкістю і тривалістю дії фактору, який викликає гіпоксію, і характеризуються різною тривалістю гіпометаболічної та гіперметаболічної фази.

4. Розвиток гіпометаболічного стану і початок фазових змін енергетичного обміну пов'язані зі стабілізацією фактору HIF-1 α , при гіперметаболічній фазі дія фактору HIF-1 обмежується активацією субодиниці HIF-3 α . Встановлено участь в розвитку гіпометаболічного стану NO-залежного відкриття K^+_{ATP} -каналів мітохондрій і його вплив на зниження споживання кисню.

5. При математичному моделюванні гіпометаболічного стану показано, що, згідно з розрахунковими показниками граничного напруження кисню в тканинах, гіпометаболізм є необхідним станом при адаптації до гіпоксії.

6. Встановлено наявність гіпоглікемії (зниження рівня глюкози на 15-20%) при фазових змінах енергетичного обміну при різних видах гіпоксії та механізми її розвитку, пов'язані зі змінами транспорту глюкози в клітину та її утилізації, зокрема, за рахунок HIF-1-залежного зростання експресії інсуліннезалежного транспортера GLUT1, інсулінзалежного транспортера GLUT4, кінази Акт.

7. Показано можливість корекції гіпометаболічного стану при експериментальній пневмонії наночастинками церію, що має позитивний ефект на енергетичний обмін, морфологічні прояви запального процесу в легенях і зменшує прояви респіраторної гіпоксії за показниками паттерну дихання, газообміну і альвеолярної вентиляції.

8. Експериментально розроблений і клінічно апробований лікувальний вплив періодичної гіпоксії при початкових стадіях діабету 2 типу, пов'язаний з HIF-1-залежною індукцією метаболічних регуляторів: інсулінових рецепторів, субодиниць K^+_{ATP} -каналів, глюкозних транспортерів, лептину, який характеризувався тривалим покращенням вуглеводного і ліпідного метаболізму у хворих.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Механізми фенотипової перебудови міокарда при хронічній гіпоксії та гіпоксичному прекодиціюванні / Портниченко А.Г., Василенко М.І., Древицька Т.І., **Портніченко В.І.** // Прекодиціювання міокарда: нові підходи та молекулярні механізми: монографія / За ред. А.Г. Портниченко. Київ, «Знання України», 2019. С.175-204. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментів, аналізі отриманих результатів та написанні розділу).*
2. Liver mitochondrial respiratory plasticity and oxygen uptake evoked by cobalt chloride in rats with low and high resistance to extreme hypobaric hypoxia / Kurhaluk N., Lukash O., Nosar V., Portnychenko A., **Portnichenko V.**, Wszedybyl-Winklewska M., Winklewski P. // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2019. Vol. 97, No 5. P. 392-399. *(Здобувач брав участь у плануванні експерименту, аналізі отриманих результатів та написанні статті)* IF 2,210 Q2
3. Effects of Intermittent Hypoxia Training on Leukocyte Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 (PDK-1) mRNA Expression and Blood Insulin Level in Prediabetes Patients / Serebrovska T.V., Portnychenko A.G., **Portnichenko V.I.**, Xi L., Egorov E., Antoniuk-Shcheglova I., Naskalova S., Shatylo V.B. European Journal of Applied Physiology. 2019. Vol.119, No 3. P.813-823. *(Здобувач брав участь у плануванні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)* IF 3.02, Q1
4. Intermittent hypoxia/hyperoxia versus intermittent hypoxia/normoxia: Comparative study in prediabetes / Serebrovska T.V., Grib O.N., **Portnichenko V.I.**, Serebrovska Z.O., Egorov E., Shatylo V.B. // High Altitude Medicine and Biology. 2019. Vol. 20, No 4. P.383-391. *(Здобувач брав участь у плануванні експерименту, статистичній обробці даних, аналізі отриманих результатів та написанні статті)* IF 1,43, Q2
5. Effects of medium-height mountain training on the functional abilities and physical fitness of mid-distance runners / Sosnovsky V.V., Pastukhova V.A., **Portnichenko V.I.**, Filippov M.M., Ilyin V.M. // Journal of Physical Education and Sport. 2019. Vol.19, No 4. P. 2379 - 2383. *(Здобувач брав участь у аналізі отриманих результатів та написанні статті)* IF 1,53, Q3
6. Effects of herbal multicomponent dietary supplement in experimental pneumonia / Serebrovska Z., Swanson R., **Portnichenko V.**, Shysh A., Tumanovska L., Dorovskych A., Dosenko V. // Фізіологічний журнал. 2018. Т. 64, № 3. С. 18-29. *(Здобувач брав участь у плануванні та проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)*
7. IGF-1-залежні протекторні механізми при гіпоксії та експериментальному діабеті / Портниченко А.Г., Василенко М.І., Лапікова-Бригінська Т.Ю., Бабічева В.В., Портніченко Г.В., Колчева М.Г., **Портніченко В.І.** // Український журнал

- медицини, біології та спорту. 2018. Т.3, №7. С.243-246. (Здобувач брав участь у проведенні експерименту, статистичній обробці даних, аналізі отриманих результатів та написанні статті)
8. Anti-inflammatory and antioxidant effect of cerium dioxide nanoparticles immobilized on the surface of silica nanoparticles in rat experimental pneumonia / Serebrovska Z., Swanson R.J., **Portnichenko V.**, Shysh A., Pavlovich S., Tumanovska L., Dorovskych A., Lysenko V., Tertykh V., Bolbukh Y., Dosenko V. // Biomedicine and Pharmacotherapy. 2017. Vol. 92. P. 69-77. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експериментальної роботи, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів та написанні статті) IF 4.55, Q1
 9. Intermittent hypoxia training in prediabetes patients: Beneficial effects on glucose homeostasis, hypoxia tolerance and gene expression / Serebrovska T.V., Portnychenko A.G., Drevytska T.I., **Portnichenko V.I.**, Xi L., Egorov E., Gavalko A.V., Naskalova S., Chizhova V., Shatylo V.B. // Experimental Biology and Medicine 2017. Vol. 242, No 15. P.1542-1552. doi: 10.1177/1535370217723578. (Здобувач брав участь у плануванні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) IF 2,688, Q1.
 10. Нові механізми ступінчастої адаптації до гіпоксії / Портниченко А.Г., Василенко М.І., Лапікова-Бригінська Т.Ю., Носар В.І., Колчева М.Г., Бабічева В.В., **Портніченко В.І.** // Патологія, реабілітація, адаптація. 2017. Т.15, №1. С.33-40. (Здобувач брав участь у плануванні експерименту, аналізі отриманих результатів та написанні статті)
 11. Гипоксическая тренировка в системе подготовки спортсменов / Ильин В.Н., Филиппов М.М., Пастухова В.А., **Портниченко В.И.**, Сосновский В.В. // Патологія, реабілітація, адаптація. 2017. Т.15, №2. С. 58-72. (Здобувач брав участь у плануванні дослідження, аналізі отриманих результатів та написанні статті)
 12. Зміни патерну дихання і кисеньзалежної частини енергетичного метаболізму при моделюванні первинної гіпоксії / **Портніченко В.І.**, Колеснікова Є.Є., Носар В.І., Колчева М.Г., Маньковська І.М., Портниченко А.Г. // Патологія, реабілітація, адаптація. 2017. Т.15, №3. С. 131-139. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів та написанні статті)
 13. Интервальная гипоксия как метод лечения предиабета: роль кислородзависимых транскрипционных факторов / Серебровская Т.В., Шатило В.Б., Портниченко А.Г., Древицкая Т.И., Егоров Е., **Портниченко В.И.** // Кислород и свободные радикалы: Сб. матер. Междунар. науч.-практ. конф. / отв. ред. В. В. Зинчук. Гродно: ГрГМУ, 2016. С.152-156. (Здобувач брав участь у плануванні експерименту, статистичній обробці даних, аналізі отриманих результатів та написанні статті)

14. Game Models for the Control of the Main Body Functional Systems and their Analysis. I / Galchyna N.I., Onopchuk Iu.N., **Portnichenko V.I.**, Siemchyk T.A. // Cybernetics and Systems Analysis. 2014. Vol. 50, N 1. P. 68-80. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) IF 0,853, Q2.
15. Game Models for the Control of the Main Body Functional Systems and their Analysis. II / Galchyna N.I., Onopchuk Iu.N., **Portnichenko V.I.**, Siemchyk T.A. // Cybernetics and Systems Analysis. 2014. Vol. 50, N 2. P. 239-247. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) IF 0,853, Q2.
16. Фазові зміни енергетичного обміну при адаптації до хронічного стресу / **Портніченко В.І.**, Носар В.І., Гончар О.О., Опанасенко Г.В., Маньковська І.М. // Фізіологічний журнал. 2014. Т. 60, №5. С. 23-32. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) Q4
17. Участие транскрипционного фактора HIF-1 в нейрональных механизмах адаптации к психоэмоциональному и гипоксическому стрессу / Рыбникова Е.А., Баранова К.А., Глущенко Т.С., Ветровой О.В., Сидорова М.В., **Портніченко В.І.** // Фізіологічний журнал. 2013. Т.59, №6. С. 88-97. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) Q4
18. Влияние различных режимов умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию HIF-1альфа в неокортексе крыс / Сидорова М.В., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В., **Портніченко В.І.**, Самойлов М.О. // Фізіологічний журнал. 2013. Т.59, №6. С.111-115. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) Q4
19. Фазовые изменения энергетического метаболизма при периодической гипоксии / **Портніченко В.І.**, Носарь В.І., Портніченко А.Г., Древицкая Т.И., Сидоренко А.М., Маньковская И.Н. // Фізіологічний журнал. 2012. Т. 58, №4. С. 3-12. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) Q4
20. Тривала адаптація щурів до гіпобаричної гіпоксії попереджує стресорну гіперглікемію та оптимізує функціональний стан мітохондрій при гострій гіпоксії / **Портніченко В.І.**, Носарь В.І., Портніченко А.Г., Сидоренко А.М., Маньковская И.Н. // Фізіологічний журнал. 2012. Т. 58, №5. С56-64. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) Q4
21. Зміни ліпідного обміну та експресії регуляторних білків в умовах середньогір'я / Портніченко Г.В., **Портніченко В.І.**, Бічекуєва Ф.Х., Бакуновський О.М.,

- Василенко М.І., Портниченко А.Г. // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2011. №2. С. 101-103. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні досліджень, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
22. **Портніченко В.І.**, Портниченко А.Г., Сидоренко А.М. Глікемія як визначальний фактор шляхів перебудови метаболізму і системи дихання при гіпоксії // Патологія. 2011. Т. 8, №2. С. 52-55. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні досліджень, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
 23. Експресія HIF-1 α і HIF-3 α в легенях та метаболічні зміни при періодичній гіпоксії у щурів різного віку / **Портніченко В.І.**, Портниченко А.Г., Досенко В.Є., Сидоренко А.М. // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2010. №2. С. 3-8. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
 24. Грабова Н.І., Онопчук Ю.М., **Портніченко В.І.** Математические модели гипометаболизма как механизма стабилизации функционального состояния организма человека // Кибернетика и системный анализ. 2009. №2. С.120-129. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті) IF 0,853, Q2.
 25. **Портніченко В.І.**, Портниченко А.Г., Сурова О.В. Гіпоглікемія та індукція генів у міокарді і легенях щурів при гіпобаричній гіпоксії // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2009. №2. С. 65-68. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
 26. Expression of HIF-1 α and HIF-3 α differentially changed in rat heart ventricles after hypoxic preconditioning / Portnychenko A.G., Dosenko V.E., **Portnichenko V.I.**, Moybenko O.O. // Proc. of XXVIII European Section Meeting of the ISHR. Medimond Intern. Proc., 2008. P.61-64. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
 27. **Портніченко В.І.**, Портниченко А.Г. Гіпоглікемічна реакція при адаптації та деадаптації до високогір'я // Патологія. 2008. Т.5, №3. С.59-60. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
 28. Морфологічні передумови розвитку гіпометаболічного стану після дії гострої гіпоксії / **Портніченко В.І.**, Павлович С.І., Портниченко А.Г., Маньковська І.М. // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2007. №2. С.131-134. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
 29. Патерн дихання та експресія iNOS в легенях і правому серці в онтогенезі при дії гострої гіпоксії / **Портніченко В.І.**, Портниченко А.Г., Василенко М.І.,

- Сидоренко А.М. // Архів клінічної та експериментальної медицини. 2007. Т.16, № 2. С. 190-193. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
30. **Портніченко В.І.** Два типи енергетичного метаболізму у щурів і їх реакція на гостру гіпоксію при активації калієвих каналів // Клінічна та експериментальна патологія. 2004. Т.ІІІ, №2. С. 86-88. (Здобувач брав участь у плануванні і проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів, написанні статті)
31. Портниченко А.Г., **Портніченко В.І.**, Василенко М.І. Спосіб гіпоксичної індукції протекторних білків. Патент на корисну модель № 142852. Заявка u202001314 від 27.02.2020. Патент опубліковано 25.06.2020, бюл. № 12/2020. (Здобувач брав участь у розробці та написанні заявки)
32. Портниченко А.Г., **Портніченко В.І.** Спосіб немедикаментозної корекції метаболічних порушень. Патент на корисну модель № 144126. Заявка u201912247 від 26.12.2019. Патент опубліковано 10.09.2020, бюл. № 17/2020. (Здобувач брав участь у розробці та написанні заявки)

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Портніченко В.І.**, Цапенко П.К., Носар В.І., Завгородній М.О., Сидоренко А.М., Портниченко А.Г. Вплив різних режимів періодичної гіпоксії на дихання і метаболізм у щурів при моделюванні діабету II типу. Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України: тези доп. VIII Нац. конгр. патофізіологів України з міжнар. участю (13-15 травня 2020 р.). – Одеса: УкрНДІ медицини транспорту, 2020. Т.1. С. 164-165.
2. Цапенко П.К., **Портніченко В.І.**, Василенко М.І., Носар В.І., Гончар О.О., Розова К.В., Сидоренко А.М., Завгородній М.О., Бабічева В.В., Алієв Р.Б., Портниченко А.Г. Порушення зовнішнього дихання та енергетичного обміну при ЛПС-індукованому запаленні у щурів // Матер. XX-го з'їзду Укр. фізіол. товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю, присв. 95-річчю з дня нар. акад. П.Г. Костюка. – Київ, 27-30 травня 2019 р. – Фізіол. журн. – 2019. – 65, №3 (дод). – С. 106.
3. **Портніченко В.І.**, Носар В.І., Маньковська І.М., Портниченко А.Г. Фазові зміни мітохондріального дихання в міокарді при впливі різних режимів гіпоксії // Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики. Матер. VII Пленуму Укр. наук. товариства патофізіологів та наук.-практ. конф., присв. 110-річчю з дня нар. М.Н. Зайка. – Полтава, 11-12 жовтня 2018 р. - С. 70-71.
4. Portnychenko A, Vasylenko M, Babicheva V, Lapikova-Bryhinska T, Kolcheva M, Nosar V, **Portnichenko V.** P526 Signal ways of hypoxia-induced cardioprotection in diabetic heart. *Frontiers in CardioVascular Biology* 2018, Vienna, Austria, 20-22 Apr 2018. *Cardiovascular Research*. 114(suppl_1):S128, APR 2018 DOI: 10.1093/cvr/cvy060.383. IF 6,29, Q1

5. **Портніченко В.І.**, Носар В.І., Гончар О.О., Маньковська І.М., Портніченко А.Г. Роль кортикостероїдів у формуванні фазових змін енергетичного обміну при адаптації щурів до хронічного стресу // Всеукр.наук.-практ. конф з міжнар. участю «Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції», присв. 105-р. з дня нар. проф. Я.Д. Кіршенבלата, Чернівці, 5-6 жовтня 2017 р. - Клін. та експ. патол. 2017; 16(3, ч.2):71.
6. Portnychenko A., Vasylenko M., Lapikova-Bryhinska T., Kolcheva M., Portnichenko H., Babicheva V., Ponomaryova I., **Portnichenko V.** P1593 Hypoxic preconditioning and metabolic rebuilding in heart ventricles of diabetic rats. ESC Congress 2017, 26-30 Aug 2017, Barcelona, Spain. European Heart Journal, 2017. 38(suppl_1). ehx502.P1593. IF 20.21, Q1
7. Portnychenko A., **Portnichenko V.**, Lapikova-Bryhinska T., Nosar V., Vasylenko M., Portnichenko H. Rebuilding of carbohydrate and lipid metabolism under hypoxia: regularities and therapeutic possibilities // Abstr. VI Chronic Hypoxia Symposium, Oct 10 - 16, 2016, La Paz, Bolivia. – Wilderness and Environmental Medicine, March 2017, V 28, Issue 1, P. e3.
8. **Portnichenko V.**, Nosar V., Portnychenko A., Drevytska T., Mankovska I. Phase changes in myocardial mitochondrial respiration caused by hypoxic preconditioning or periodic hypoxic training. Frontiers in CardioVascular Biology 2016. Cardiovascular Research 111 (suppl 1), S111. IF 5,465, Q1
9. **Portnichenko V.**, Portnychenko A., Nosar V., Vasylenko M., Lapikova-Bryhinska T. Carbohydrate and lipid metabolism rebuilding under hypoxia: mechanisms and therapeutic potential // Abstr. International Conference “Advances in Pneumology”. Warsaw, Poland, October 7-8, 2016, a b43.
10. **Portnichenko V.I.**, Portnychenko A.G., Nosar V.I., Drevitskaya T.I., Mankovska I.N. Dynamics of energy metabolism in the recovery period after acute hypoxia and during periodic hypoxia // International Conference “Advances in Pneumology”. Kassel, Germany, October 25-26, 2013 http://www.pneumology.pl/pdf/ab119_1.pdf
11. **Портніченко В.І.**, Носарь В.І., Портніченко А.Г., Маньковская И.Н. Фазовые изменения дыхания и энергетического метаболизма при различных видах гипоксии // VI Нац. конгрес патофізіологів України з міжнар. участю, Сімферополь-Місхор, 3-5 жовтня 2012 р. – Таврійський мед.-біол. вісник, 2012. – Т.15, №3, ч.2. – С. 370.
12. **Портніченко В.І.**, Носарь В.І., Портніченко А.Г., Маньковская И.Н. Общие закономерности перестройки дыхания и энергетического метаболизма при различных видах гипоксического воздействия // VIII Всерос. конф. с междунар. участием, посв. 220-л. со дня рожд. ак. К.М. Бэра, С.-Петербург, Россия, 25-28 сент. 2012 г. Тезисы докл. – СПб., 2012. – С. 187.
13. **Портніченко В.І.**, Носарь В.І., Портніченко А.Г., Сидоренко А.М., Маньковская И.Н. Фазовые изменения дыхания и энергетического метаболизма в периоде восстановления после острой гипоксии // 2 Міжнар. наук. конф.

- «Високогірна гіпоксія і геном», Терскол, Росія, 14-17 серпня 2012. Тези доп. – Фізіол. журн., 2012.- 58, №4.- С. 77.
14. **Портниченко В.И.**, Портниченко А.Г., Носарь В.И., Древицкая Т.И., Сидоренко А.М. Активация жирового обмена при длительной адаптации к среднегорью модулирует реакцию на острую гипоксию у крыс // VI Российская конф. с междунар. участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция», Москва, Россия, 11-13 октября 2011 г. – Патогенез. – 2011. – 9, №3. – С. 52.
 15. **Portnichenko V.I.**, Portnychenko A.G., Vasylenko M.I., Drevytska T.I. Three-phase respiratory response and hyperglycemia in recovery period after acute hypoxia. International Conference “Advances in Pneumology”, Bonn, Germany, 17-18 June 2011. <http://www.pneumology.uni.opole.pl/media/doc/a083.pdf>
 16. **Портниченко В.И.**, Портниченко А.Г., Носарь В.И., Древицкая Т.И., Суровая О.В. Глюкозоопосредованные механизмы адаптации к высокогорной гипоксии и гипоксического preconditionирования// XXI Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова, Калуга, Россия, 19-25 сентября 2010 г. Тезисы докл. – М.-Калуга, Типография ООО «БЭСТ-Принт», 2010. – 760 с.- С.498.
 17. **Портниченко В.И.**, Носарь В.И., Павлович С.И., Портниченко А.Г., Маньковская И.Н. Периодическая гипоксия: фазовые изменения дыхания и энергетического метаболизма // Матер. V Пленуму наук. товариства патолофізіологів України, присв. 110-річчю з дня нар. М.М.Горєва, Луганськ, 9-10 вересня 2010 р. – Загальна патологія та патологічна фізіологія, 2010, Т.5, №2. – С.34-35.
 18. **Портніченко В.І.**, Носар В.І. Гіпоглікемія та зміни у жировому обміні у щурів на різних етапах адаптації до середньогір'я // Матер. 18 з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнар. участю, Одеса, 20-22 травня 2010 р. – Фізіол.журн., 2010, 56, №2.- С. 167-168.
 19. **Portnichenko V.I.**, Nosar V.I., Surova O.V., Portnychenko A.G. Modulation of carbohydrate and lipid metabolism in rats during adaptation to high altitude hypoxia. International Conference “Advances in Pneumology”, Warsaw, Poland, 27-29 May 2010. <http://www.pneumology.uni.opole.pl/media/doc/a043.pdf>
 20. **Portnichenko V.I.**, Portnychenko A.G., Dosenko V.Ye., Sydorenko A.M. Expression of HIF-1 α and HIF-3 α in lungs, and metabolic changes in rats of different age under periodic hypoxia influence // VI Annual Ukrainian-Polish Conference “Current aspects of lung diseases: Pathophysiology, diagnostics, treatment”, Ternopil, Ukraine, 24-25 September 2009.- Тернопіль, «Укрмедкнига», 2009.- С.103-104.
 21. **Портниченко В.И.**, Суровая О.В., Досенко В.Е., Портниченко А.Г.. Экспрессия транспортеров глюкозы GLUT-1 и GLUT-4 в тканях крыс при адаптации к условиям среднегорья и действию гипобарической гипоксии // VII Всерос. конф. з міжн. участю, присв. 160-р. з дня нар. І.П.Павлова «Механизмы функционирования висцеральных систем», С.-Петербург, Росія, 29 вересня - 2 жовтня 2009 р. – Тези доп.- СПб, 2009. – С. 355.

22. Portnychenko A.G., Dosenko V.E., **Portnichenko V.I.**, Moybenko O.O. Expression of HIF-1 α and HIF-3 α differentially changed in rat heart ventricles after hypoxic preconditioning // XXVIII European Section Meeting of the ISHR, Athens, Greece, May 28-31, 2008. Abstracts. - J. Molec. Cell. Cardiology, 44 (4), 2008. – P.724. IF 4,133, Q1
23. **Портніченко В.І.**, Портниченко А.Г. Гіпоглікемічна реакція при адаптації та деадаптації людини до високогірних умов // Наук. конф. з міжн. участю «Високогірна гіпоксія і геном», Терскол, Росія, 14-17 серпня 2008. Тези доп. – Фізіол. журн., 2008.- 54, №4.- С. 84-85.
24. Онопчук Ю. Н., **Портниченко В. И.** Гипометаболизм тканей как механизм адаптации организма к гипоксии высокогорья // Там само. – С. 45.
25. **Портниченко В. И.**, Ильин В. Н., Онопчук Ю. Н. Гипометаболическое состояние как механизм адаптации организма к гипоксии нагрузки // Там само. – С.46.
26. Носар В.І., **Портніченко В.І.**, Гавенаускас Б.Л., Сидоренко А.М. Активация жирового обмена при гипометаболическом состоянии под час високогірної гіпоксії у адаптованих щурів // Там само.- С. 81.
27. **Портниченко В.И.**, Носарь В.И., Dosenko V.E., Павлович С.И., Портниченко А.Г., Маньковская И.Н. Молекулярно-генетические механизмы развития гипометаболического состояния при высокогорной гипоксии // V Всерос. конф. з міжн. участю, присв. 100-р. з дня нар. В.М.Черниговського, С.-Петербург, Росія, 16-19 жовтня 2007 р. – Тези доп.- СПб, 2007. – С. 254-255.
28. **Портніченко В.І.**, Павлович С.І., Портниченко А.Г., Маньковська І.М. Морфологічні передумови розвитку гіпометаболического стану після дії гострої гіпоксії // Матер. наук.-практ. конф. «Досвід і проблеми застосування сучасних морфологічних методів досліджень органів і тканин у нормі та при діагностиці патологічних процесів», Тернопіль, 24-25 травня 2007. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2007. – С. 117.
29. **Portnichenko V.I.**, Nosar V.I., Portnychenko A.G., Rozova K.V., Mankovskaya I.N. Changes in breathing and mitochondrial respiration in rats living in high altitude during intermittent hypoxia training // VIII World Congress of International Society for Adaptive Medicine. Moscow, Russia, June 21-24, 2006. Abstracts. II-10.06. P. 162.
30. **Портниченко В.И.**, Портниченко А.Г., Белошицкий П.В., Полушина Н.Д. Особенности развития гипометаболического состояния у крыс в среднегорье // Матер. 4-й Всеросс. конф. (с междунар. участием) «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция», Москва, Россия, 12-14 окт 2005. - М., 2005.- С. 93.
31. **Портниченко В.И.**, Белошицкий П.В., Полушина Н.Д., Ильин В.Н., Портниченко Г.В., Евтушенко А.Л., Кравченко Ю.В. Влияние периодической гипоксической тренировки на адаптацию системы дыхания и терморегуляцию у крыс в среднегорье // IV Всеросс.конф. с междунар. участием «Механизмы функционирования висцеральных систем», посв. 80-л. Ин-та физиологии им.

И.П.Павлова РАН, С.-Петербург, Россия, 4-6 окт 2005. Тез.докл. – СПб, 2005.- С.196-197.

32. **Portnichenko V.**, Rozova K., Beloshytsky P., Polushyna N., Lyashev K. Pattern of breathing lung ultrastructure and metabolic rate after intermittent hypoxic training of rats in high altitude stay. Abstr. VI World Congr. Mountain & High Altitude Physiol. // High Altitude Med. & Biol. - 2004. - V. 5, N 2. - P. 253. IF 1,43, Q2
33. **Портніченко В.І.**, Середенко М.М. Дія фторвмісних активаторів калієвих каналів на кисеньтранспортну систему при моделюванні гострої важкої гіпоксичної гіпоксії у щурів / Матер. XVI з'їзду Укр. фізіол. т-ва, Вінниця, 28-30 травня 2002 р. - Фізіол. журн. - 2002. - т.48, № 2. - С. 90.

АНОТАЦІЯ

ПОРТНІЧЕНКО В.І. Механізми розвитку гіпометаболічного стану при гіпоксії та нові підходи до патогенетичної корекції гіпоксичних і метаболічних порушень. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2021.

Дисертацію присвячено дослідженню основних механізмів впливу різних видів гіпоксії на енергетичний обмін та визначенню нових підходів до патогенетичної корекції метаболічних порушень. Дослідження проведено на щурах лінії Вістар при впливі гострої, періодичної, хронічної гіпоксії, моделюванні первинної, респіраторної гіпоксії та іммобілізаційного стресу; охарактеризовано статеві та онтогенетичні відмінності. Клінічні дослідження проведено на добровольцях середнього та похилого віку, а також хворих з метаболічним синдромом, предіабетом, діабетом 1 і 2 типу, мешканцях рівнини та середньогір'я, при впливі гострої, хронічної, переривчастої інтервальної гіпоксії.

Одержані результати свідчать, що основною реакцією на вплив різних видів гіпоксії є розвиток гіпометаболічного стану, пов'язаного з порушенням синтезу АТФ в клітинах. Встановлено, що ключову роль у його розвитку відіграє стабілізація факторів транскрипції HIF-1 α і HIF-3 α , які стимулюють активацію захисних і адаптивних генів, в тому числі, iNOS, MnSOD, кавеоліну-3, Akt, GLUT-1 і -4. Активуються стійкі до гіпоксії білки аеробної частини енергетичного обміну і гліколізу. Також внаслідок дії гіпоксії спостерігається мітохондріальна дисфункція, порушення роботи комплексу I, зниження окиснення НАД-залежних і домінування окиснення ФАД- залежних субстратів, розвиток окисного стресу та гіперглікемічної реакції. Комплексні зміни метаболічних параметрів вказують на спільні риси стрес-реактивних механізмів та відповіді на гіпоксію різного генезу.

Встановлено фазовий характер змін метаболізму у відповідь на гіпоксію різного генезу та стрес. Гіпометаболічна фаза триває 5-9 діб в залежності від глибини і тривалості гіпоксичного стимулу. Після нетривалої перехідної фази розвивається гіперметаболічна фаза, яка характеризується значним зростанням енергетичного метаболізму і HIF-залежним обмеженням функції HIF-1. В

мітохондріях зростає спряження окиснення з фосфорилуванням, відновлення функціонування комплексу 1 електронтранспортного ланцюга, домінування окиснення НАД-залежних субстратів над ФАД-залежними, зростання продукції АТФ, знижується теплопродукція. Відповідно до підвищення споживання кисню зростає функція зовнішнього дихання. Зростає експресія інсулінових рецепторів та транспортерів глюкози, розвивається гіпоглікемія, а при метаболічних порушеннях спостерігається покращення вуглеводного і ліпідного метаболізму. Через 16-18 днів розвивається адаптивна фаза, нормалізуються функціональні показники організму і встановлюється новий стан енергетичного обміну організму, при якому реакція на гіпоксичний або стресорний стимул зменшується або відсутня. Важливим результатом є встановлення факту, що на зміну фаз не впливає рівень готовності кисеньтранспортної системи до підвищення метаболічних потреб тканин, що є фактором ризику.

Розроблені методи корекції та теоретичні висновки дозволяють рекомендувати призначення глюкокортикоїдних гормонів як складових патогенетичної терапії, що дозволяє відтермінувати настання гіперметаболічної фази, а також лікування наночастинками церію для корекції порушень у гіпометаболічній фазі.

Ключові слова: гіпоксія, адаптація, паттерн дихання, газообмін, мітохондріальне дихання, гіпоксичні тренування, високогірна гіпоксія, гіпоглікемія, цукровий діабет, HIF-1 α , HIF-3 α , оксид азоту, калієві канали, кінази, транспорт глюкози.

SUMMARY

PORTNICHENKO V.I. Mechanisms of hypometabolic condition development in hypoxia, and new approaches to pathogenetic correction of hypoxic and metabolic disorders. – A manuscript.

Thesis for the Doctor of Medical Sciences degree, specialty 14.03.04 - Pathological Physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the research of the main mechanisms of influence of different types of hypoxia on energy metabolism, and to create new approaches to pathogenetic correction of metabolic disorders. The study was performed in Wistar rats under the influence of acute, periodic, chronic hypoxia, simulation of primary, respiratory hypoxia and immobilization stress; gender and ontogenetic differences are characterized. Clinical trials have been performed in healthy middle-aged and elderly volunteers, as well as patients with metabolic syndrome, prediabetes, type 1 and 2 diabetes, plain and mid-mountain residents, under the influence of acute, chronic, intermittent interval hypoxia.

The results showed that the main reaction to the influence of various types of hypoxia is the development of a hypometabolic state associated with impaired ATP synthesis in cells. Transcription factors HIF-1 α and HIF-3 α were identified as key molecules in this response, which stimulate the activation of protective and adaptive genes, including iNOS, MnSOD, caveolin-3, Akt, GLUT-1 and -4. Hypoxia-resistant proteins of the aerobic part of energy metabolism and glycolysis, and KATP channels are activated. Also, mitochondrial dysfunction, especially of complex I, decreased oxidation of NAD-

dependent and the prevalence oxidation of FAD-dependent substrates, the development of oxidative stress and hyperglycemic reaction were found due to hypoxia. Complex changes in metabolic parameters indicate common features of stress-reactive mechanisms, and responses to hypoxia of different genesis.

The phase nature of metabolic changes in response to hypoxia of various genesis and stress has been established. The hypometabolic phase lasts 5-9 days depending on the depth and duration of the hypoxic stimulus. After a short transition phase, a hypermetabolic phase develops, which is characterized by a significant increase in energy metabolism and HIF-3-dependent limitation of HIF-1 function. In mitochondria, the coupling of oxidation and phosphorylation increases, the functioning of complex 1 of the electron transport chain resumes, the oxidation of NAD-dependent substrates dominates over FAD-dependent ones, the ATP production rises, and heat production decreases. According to the increase in oxygen consumption, the respiration rises. The expression of insulin receptors and glucose transporters increases, hypoglycemia develops; in patients with metabolic disorders there is an improvement in carbohydrate and lipid metabolism. After 16-18 days, the adaptive phase develops, the functional parameters of the body are normalized, and a new state of energy metabolism of the body is established, in which the reaction to a hypoxic or stressful stimulus is reduced or absent. An important result is the establishment of the fact that the change of phases is not affected by the level of readiness of the oxygen transport system to increase the metabolic needs of tissues, which is a risk factor. The developed methods of correction and theoretical conclusions allow to recommend the appointment of glucocorticoid hormones as components of pathogenetic therapy, which allows to delay the onset of the hypermetabolic phase, as well as treatment with cerium nanoparticles to correct disorders in the hypometabolic phase.

Key words: hypoxia, adaptation, pattern of breathing, gas exchange, mitochondrial respiration, hypoxic training, high-altitude hypoxia, hypoglycemia, diabetes, HIF-1 α , HIF-3 α , nitric oxide, potassium channels, kinases, glucose transport.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

eNOS – ендотеліальна синтаза оксиду азоту
 f – частота дихання
 GLUT, SLC2 – транспортери глюкози
 HIF – гіпоксія-індуцибельний фактор
 IGF-1 – інсуліноподібний фактор росту-1
 iNOS – індуцибельна синтаза оксиду азоту
 KCNJ8 – субодиниця АТФ-залежних калієвих каналів
 MnSOD – Mn-вмісна супероксиддисмутаза
 PAO₂ – парціальний тиск O₂ в альвеолах
 PACO₂ – парціальний тиск CO₂ в альвеолах
 V₃/V₄ – дихальний контроль за Чансом
 V_E – вентиляційний еквівалент Антоні
 \dot{V}_E – хвилинний об'єм дихання
 \bar{V}_I – середня швидкість потоку повітря на вдиху
 $\dot{V}O_2$ – споживання кисню
 V_T – дихальний об'єм
 АДФ/О – коефіцієнт ефективності фосфорилування
 АКК – активатори АТФ-залежних калієвих каналів
 ГГ – гостра гіпоксія
 Гл – глутамат і малат
 ЕТЛ МХ – електронтранспортний ланцюг мітохондрій
 ІГТ – інтервальне гіпоксичне тренування переривчастою гіпоксією
 ІС – іммобілізаційний стрес
 КАТФ-канали – АТФ-залежні калієві канали
 КГ – каротидний гломус
 ЛПВЩ – ліпопротеїди високої щільності
 ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності
 ЛПС – ліпополісахарид E. coli
 НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид
 ПГ – періодична гіпоксія
 Пм – пальмітоїл-І-карнітин і малат
 ПТГ – первинна тканинна гіпоксія
 РДК – резерв дихального контролю
 Ск – сукцинат
 Тт – температура тіла
 ТТГ – тест толерантності до глюкози
 ФАД – флавінаденіндинуклеотид
 ХГ – хронічна гіпоксія
 ЦІА – центральна імпульсна активність