

Российская академия наук

Монография

Л.Д. Лукьянова

Сигнальные механизмы гипоксии

Москва
2019

УДК 612.127.2

ББК 28.073

Л 84

Автор:

Лукьянова Л.Д.

Л 84 **Лукьянова Л.Д.** Сигнальные механизмы гипоксии / Л.Д. Лукьянова, – М: РАН, 2019. – 215 с.: ил.

ISBN 978-5-907036-45-1

Монография посвящена анализу современных представлений о ведущей роли митохондрий в сложнейшей системе внутриклеточной и межклеточной сигнализации. Ключевым вопросом является механизм вовлечения митохондриальных ферментов в ответную реакцию на разные режимы гипоксических воздействий, а также их участие в формировании как ранних, так и поздних адаптивных реакций, обеспечивающих сохранение энергосинтезирующей функции дыхательной цепи в широком диапазоне сниженных значений концентрации кислорода и формирование системного ответа организма на дефицит кислорода. При этом рассматриваются следующие вопросы: 1) Какова роль митохондрий и энергетического обмена в клеточном и системном сигналинге, а также в формировании срочной и долговременной адаптации к гипоксии; 2) Каким образом осуществляется сенсорная функция митохондриальной дыхательной цепи по отношению к кислороду; 3) Какова зависимость этих процессов от характера гипоксических воздействий (их силы, длительности, режимных особенностей), каковы оптимальные условия для их формирования, какими функционально-метаболическими параметрами они описываются; какими параметрами диагностируется зона риска; 4) Каковы молекулярные механизмы тканеспецифических особенностей реагирования на гипоксию индивидуумов с различной толерантностью к ней; 5) Каковы механизмы взаимодействия митохондрий с другими сигнальными системами при формировании срочной и долговременной адаптации; 6) Каковы подходы создания таргетных антигипоксических, энерготропных средств, ускоряющих и облегчающих формирование срочных и долгосрочных механизмов адаптации к гипоксии.

Монография может представлять интерес для широкого круга специалистов – биологов и медиков, занимающихся проблемами кислород-дефицитных состояний.

ISBN 978-5-907036-45-1

© Лукьянова Л.Д., 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	5
Предисловие.....	7
Глава I РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТОЧНОМ СИГНАЛИНГЕ.....	13
1.1 Митохондрии: исторические аспекты.....	13
1.2 Происхождение митохондрий.....	15
1.3 Структурно-функциональные особенности митохондрий	19
1.4 Митохондриальная дыхательная цепь	23
1.5 Митохондриальный геном.....	29
1.6 Митохондриальная динамика и ее роль в жизнедеятельности клетки	30
1.6.1 Митохондриальное слияние.....	32
1.6.2 Интерфазное деление митохондрий.....	33
1.6.3 Митофагия.....	35
1.6.4 Подвижность и локализация митохондрий.....	36
1.6.5 Митохондриальная динамика и функция клетки.....	42
Глава II МИТОХОНДРИЯ И КИСЛОРОД (МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ).....	44
2.1 Кислород, клетка, митохондрии.....	44
2.2 Градиент O_2 на участке плазматическая мембрана – митохондрия.....	49
2.3 Дыхание как показатель состояния энергетического обмена.....	52
2.4 «Градации метаболических состояний» и биохимический цикл возбуждения	55
2.5 Адениннуклеотидный пул и его роль в поддержании энергетического гомеостаза в клетке.....	56
2.6 Структурно-функциональные особенности митохондрий животных с разной резистентностью к гипоксии и их роль в формировании «функционально-метаболического портрета»	57
2.7 Регуляторная роль митохондрий в жизнедеятельности организма (митохондриальная физиология)	67
Глава III РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТОЧНОМ СИГНАЛИНГЕ ПРИ ГИПОКСИИ (МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ПРИ КИСЛОРОД-ДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЯХ).....	70
3.1 Срочная системная реакция на гипоксию	70
3.2 Тканевая (биоэнергетическая) гипоксия.....	74
3.3 Действие гипоксии на структурно-морфологический паттерн митохондрий	76
3.4 Регуляторная роль аденилатного пула в условиях гипоксии	81
3.5 Реакция электрон-транспортной функции дыхательной цепи на гипоксические воздействия	83
3.5.1 Срочная реакция МФК I на гипоксию	87
3.5.2 Срочная реакция МФК II на гипоксию	88
3.5.3 Особенности срочной динамики содержания митохондриальных ферментов при гипоксии	90
3.6 Митохондриальная «дисфункция» – типовой патологический процесс.....	97

Глава IV РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ФОРМИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ.....101

4.1 Роль митохондрий в формировании биоэнергетических механизмов срочной адаптации к гипоксии	101
4.2 Роль митохондрий в формировании биоэнергетических механизмов долговременной (отсроченной) адаптации к гипоксии.....	103
4.3 Сигнальная роль митохондрий в условиях гипокситерапии.....	112
4.3.1 Сравнительный анализ действия разных гипоксических режимов на формирование срочной и отсроченной резистентности организма.....	113
4.3.2 Особенности работы митохондриальной дыхательной цепи при разных режимах гипокситерапии.....	116
4.4 Роль ПОЛ и окислительно-восстановительных процессов при формировании адаптации к гипоксии	119

Глава V РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТОЧНОМ СИГНАЛИНГЕ.....123

5.1 Сигнальная роль митохондрий в клеточно-межклеточных взаимодействиях ..	123
5.2 Сукцинат-зависимые сигнальные пути и их регуляторная роль при гипоксии.....	125
5.2.1 Сигнальная роль сукцината в жизнедеятельности организма.....	125
5.2.2 Митохондрии и транскрипционная активность HIF-1 α	129
5.2.3 Митохондрии и особенности экспрессии сукцинат-зависимого рецептора GPR91 (SUCNRI) при гипоксии.....	135
5.2.4 Гормонально-рецепторный контроль энергетического обмена при гипоксии	142

Глава VI ЭНЕРГОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДИСФУНКЦИЙ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ, ВКЛЮЧАЮЩИХ ГИПОКСИЧЕСКУЮ КОМПОНЕНТУ (МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ).....145

6.1 История вопроса.....	145
6.2 Энерготропные препараты, способствующие формированию шунтирующих МФК I путей окисления.....	148
6.2.1 Активация сукцинатаксидазного окисления за счет эндогенных источников сукцината	149
6.2.2 Применение экзогенных солей сукцината для активации при гипоксии сукцинатаксидазного окисления	150
6.2.3 Применение различных синтетических органических производных сукцината	151
6.2.4 Коррекция энергетического обмена при гипоксии фумарат-содержащими препаратами	155
6.2.5 DT-диафоразный шунт и энерготропные препараты витамин-К ₃ подобного действия (антигипоксанты, адаптогены)	156
6.3 Коррекция терминального участка дыхательной цепи при гипоксии энерготропными препаратами прямого действия.....	164
6.3.1 CoQ и его аналоги	164
6.3.2 Цитохром с.....	169
6.4 Антигипоксанты непрямого (неспецифического) действия.....	170

Заключение.....	173
Список литературы	180

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	–	аденозин-5-дифосфат
АМФ	–	аденозин-5-монофосфат
Σ АН	–	сумма аденилатов
АТФ	–	аденозин-5-трифосфат
АФК	–	активные формы кислорода
Вж	–	время жизни животных на критической высоте (11 000-11 500 м) до второго агонального вдоха.
ВУ	–	высокоустойчивые животные
ГБГ	–	гипобарическая гипоксия
ДК	–	коэффициент дыхательного контроля
ДНК _{мх}	–	ДНК митохондрий
ИМФ	–	инозинмонофосфат
ИНГ	–	интервальная гипоксия
КрФ	–	креатинфосфат
ЛПН	–	липопротеины низкой плотности
МММ	–	митохондриальные связывающие ассоциативные мембраны
МДА	–	малоновый диальдегид
МФК	–	митохондриальный ферментный комплекс
НАД	–	окисленный никотинамидадениндинуклеотид
НАДН	–	восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида
НАДФН	–	восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид-фосфата
НАД(Ф)Н-ДГ	–	митохондриальные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы
НГБ	–	нормобарическая гипоксия
НУ	–	низкоустойчивые животные
ОФ	–	окислительное фосфорилирование
ОХРНОС	–	система окислительного фосфорилирования
ПНН	–	пиридиннуклеотиды
ПОЛ	–	прекисное окисление липидов
pO_2	–	парциальное давление (напряжение) кислорода
СДГ	–	сукцинатдегидрогеназа
СОД	–	супероксиддисмутаза
ТБК	–	тиобарбитуровая кислота
<i>цит с</i>	–	<i>цитохром с</i>
ЦТК	–	цикл трикарбоновых кислот
ЦХО	–	цитохромоксидаза
ФМН	–	флавиномононуклеотид
ФП	–	флавопротеиды
ЭЗ	–	энгергетический заряд
ЭР	–	эндоплазматический ретикулум
ANT	–	adenine nucleotide translocator
АТР5А	–	субъединица АТФ-азы (ATP synthase alpha chain)
СоQ	–	убихинон

COX1	– (Cytochrome c oxidase subunit I)
Cyt b	– (Cytochrome b)
GTP, GDP	– гуанозинтри- и дифосфат
MCU	– митохондриальный кальциевый унипортер
NDUFV2	– (NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein
PAM	– plasma membrane associated mitochondria
PINK1	– PTEN-индуцированная киназа 1
PTP	– permeability transition pore
SDHA	– a flavochrome subunit A of succinate dehydrogenase
V_3	– скорость окисления субстрата в состоянии 3
V_4	– скорость окисления субстрата в состоянии 4
VDAC	– порин

ПРЕДИСЛОВИЕ

Гипоксия – чрезвычайно широко распространенное явление, возникающее как в условиях дефицита кислорода во внешней среде, так и в результате самых разных патологий, приводящих к снижению доставки кислорода к клетке до уровня, недостаточного для поддержания ее функции, метаболизма и структуры. Млекопитающие, и прежде всего человек, хотя и имеют систему анаэробного образования энергии, связанную с гликолизом, относятся к строгим аэробам, у которых прекращение доступа воздуха, содержащего кислород, уже через несколько минут завершается летальным исходом. Согласно современным представлениям, любое патологическое состояние прямо или косвенно связано с нарушением кислородного гомеостаза организма.

Многие заболевания сердечно-сосудистой системы, легких и крови, цереброваскулярные патологии, геморрагический, травматический, ожоговый шок, некоторые токсические состояния, функциональные нагрузки сопровождаются развитием гипоксии или ишемии (Гусев, Скворцова, 2001; Суслина и др., 2006).

Исключительно остро стоит вопрос устранения последствий гипоксии в реаниматологии и трансплантологии в связи с необходимостью расширения возможностей сохранения функциональной активности органов и тканей после временного прекращения кровотока (Неговский и др., 1987).

Самостоятельной проблемой является влияние экзогенной гипоксии на организм. Газовый состав воздушной среды, и прежде всего, содержание в ней кислорода, приобретает особую значимость в связи с ухудшением экологии, а также экстремальными ситуациями, связанными с полетами, восхождениями, погружениями и пр. (Агаджанян, 1970-2003; Агаджанян, Миррахимов, 1970; Коробков, 1980; Махновский, 1999; Меерсон, 1973-2009; Новиков, 2000; Сиротинин, 1963-1977).

Распространенность патологий, включающих гипоксическую компоненту, определяет исключительную важность и необходимость понимания механизмов гипоксии, а также социальную значимость проблемы защиты организма от кислородной недостаточности и сопутствующего энергодефицита, в том числе через процесс адаптации к ней – т. е. приспособление организма к изменению содержания кислорода в среде.

Понимание того, что дефицит кислорода в окружающей среде оказывает огромное влияние на жизнедеятельность организма и требует специального изучения, пришло лишь в конце XIX века. Толчком для развития этого направления явилась гибель первых аэронавтов, поднявшихся на воздушных шарах в разреженные слои атмосферы, после чего проблемой гипоксии стали заниматься во всем мире. Изучение физиологических механизмов гипоксии и адаптации к ней стало одним из ведущих направлений фундаментальной и прикладной медицины в России конца XIX-начала XX века. В нашей стране научные аспекты этой проблемы начали решаться в лабораториях И.М. Сеченова, В.В. Пашутина, П.М. Альбицкого, Е.А. Карташевского. В более поздний период гипоксия стала главной темой исследований Н.Н. Сиротинина, А.М. Чарного, И.Р. Петрова, З.И. Барбашовой, М.С. Гаевской, А.З. Колчинской, Н.А. Агаджаняна, Ф.З. Меерсона, М.М. Мир-

рахимова. В 60-десятые годы прошлого столетия по инициативе русских ученых было создано Международное общество по адаптации к гипоксии, которое возглавлялось профессором З.И. Барбашовой. После ее смерти, однако, общество прекратило свою деятельность.

К настоящему времени в нашей стране накоплен огромный экспериментальный материал как о физиологических механизмах гипоксии, так и о возможности значительного повышения устойчивости организма (адаптации) различных видов животных и человека к гипоксии (Сиротинин Н.Н., 1934; Барбашова З.И., 1960, Меерсон Ф.З., 1973-1993; Агаджанян Н.А., 1970-2006; Миррахимов М.М., 1970-1990; Махновский В.П., 1999).

Результаты многолетних исследований позволили использовать адаптацию к высокогорному климату для подготовки и тренировки космонавтов. Более того, адаптация к недостатку кислорода с помощью барокамерной тренировки и дыхания газовыми смесями при нормальном атмосферном давлении (гипокситерапия) стала применяться в медицинской практике (Апполонов А.П., 1938; Голубов Н.Н., 1939; Шик Л.Л., 1940; Гуревич М.О., 1941). В послевоенное время гипоксические барокамерные тренировки в режиме ступенчатой адаптации по Сиротинину широко применялись для лечения больных бронхиальной астмой, анемией, инсулинозависимыми формами диабета, шизофренией, нарушениями сердечно-сосудистой систем, а также для повышения работоспособности и резистентности летного состава, спортсменов и пр.

Одним из новых способов осуществления гипоксической тренировки явилось использование газовых смесей в «циклическом» режиме. Этот метод, известный в специальной литературе как «прерывистая или интервальная гипоксическая тренировка», предполагает чередование кратковременного вдыхания гипоксической газовой смеси с кратковременным дыханием воздухом с нормальным содержанием кислорода. Он успешно используется для лечения бронхиальной астмы, хронических неспецифических заболеваний дыхательных путей, для лечения ишемической болезни сердца, ревматоидного артрита, анемии, вегето-сосудистой дистонии, в акушерской практике, гинекологии, для ускорения заживления послеоперационных ран, в качестве радиопротекторного средства, в онкологии (Стрелков, 1997; Стрелков, Чижов, 2001; Караш, Стрелков, Чижов, 1988; Колчинская и др., 1992; Махновский, 1999; Лукьянова, 2000; Lukyanova et al., 2003, 2010, 2012).

В ранний период истории адаптационной медицины и биологии (до 60-х – 70-х годов XX столетия) это направление успешно развивалось преимущественно в России и в ряде дружественных ей стран (Чехословакии, Индии). В США первые упоминания о применении интервальной гипоксии появились в 70-е годы XX столетия. Однако последние 2-3 десятилетия характеризуются постоянно нарастающим интересом зарубежных исследователей к вопросам адаптации. Несомненное влияние на этот процесс оказало создание в 1990 г. по инициативе российских ученых Меерсона Ф.З. и Лукьяновой Л.Д. и при финансовой поддержке Всесоюзного общества культурных связей с зарубежными странами СССР Международного общества по адаптационной медицине (The International Society for Adaptive Medicine – ISAM), которое активно действует и в настоящее время. Его первым президентом был проф. Меерсон Ф.З. В настоящее время опубликовано 11 томов периодических из-

даний трудов этого общества по вопросам адаптации в медицине и биологии (Adaptation Biology and Medicine. – Eds: Singal P.K. et al. Narosa Publishing House New Dehli, India. V. 1-11. 1999 – 2018). В 2006 г. очередной VIII международный конгресс этого общества (президент конгресса и впоследствии – пожизненный почетный президент ISAM – член-корреспондент РАН Лукьянова Л.Д.) был организован и проведен в Москве и получил высокую оценку специалистов и общественности. В 2018 г. в Тайланде успешно прошел 12 конгресс ISAM. В период 2000-2015 гг. координацию исследований в области гипоксии в нашей стране осуществлял Научный совет по проблемам гипоксии Российской Академии Медицинских Наук.

На Западе интерес к этой проблеме возник несколько позже. Так в конце 90-х годов в США по инициативе Президента Клинтона был создан Национальный институт здоровья, который стал заниматься проблемами адаптации. В 1999 г. в США Национальный Институт сердца, легких и крови создал программу изучения влияния интервальной гипоксии на механизмы кардио-пульмонологических, сосудистых и гематологических патологий. Созданы Центры и лаборатории, занимающиеся этой проблемой, в Техасе и Вирджинии. Аналогичная тенденция имеет место и в Западной Европе и Азии. Появились большие научные коллективы, занимающиеся вопросами адаптации к гипоксии в Австрии, Франции, Германии, Польше, Англии, Индии, Японии, Китае.

Заново открыт и широко применяется используемый еще Сиротининым Н.Н. способ ступенчатой адаптации, который получил на Западе название *эффекта прекондиционирования* (Murty, 1986). Под последним понимают активацию срочных защитных механизмов адаптации в результате короткого эпизода слабого, неповреждающего гипоксического или ишемического воздействия, способствующего увеличению переносимости последующего отсроченного, более тяжелого воздействия гипоксии.

В настоящее время накоплен огромный банк данных, свидетельствующий о возможности под влиянием гипоксических тренировок значительно повышения устойчивости организма различных видов животных и человека не только к гипоксическим, но и другим экстремальным условиям и патологическим состояниям (перекрестная или кросс-адаптация по терминологии Меерсона Ф.З.) сопровождающимися нарушениями кровоснабжения (кровопотеря, травмы, действия физических и химических агентов, воспалительные процессы, инфекционные заболевания, лучевая болезнь и пр.). Созданы различные классификации гипоксических состояний, получены функциональные и метаболические прогностические критерии их оценки, установлены особенности их проявления на системном уровне. При этом определены особенности реакции на гипоксию дыхательной, сердечно-сосудистой, транспортной систем, нейро-гормональной регуляции.

Сложная динамика реакции организма на гипоксию и адаптацию к ней, вовлеченность в этот процесс широкого спектра функционально-метаболических систем, лимитирующих участков и механизмов, делающих его мультикомпонентным, полиорганным и многоступенчатым, объясняют причину того, что, несмотря на почти столетнюю историю изучения адаптации к гипоксии, до настоящего времени остаются нерешенными многие ее патогенетические аспекты, а также вопросы, связанные с антигипоксической защитой.

Так например до последнего времени оставался открытым вопрос о том, как быстро происходит формирование срочной резистентности в условиях гипоксии, как быстро активируются механизмы, индуцирующие этот процесс, и что является триггерным звеном этого процесса.

На сегодняшний день наиболее актуальными и изучаемыми вопросами, относящимися к проблеме адаптации к гипоксии, по-прежнему остаются: оценка направленности действия на организм различных режимов гипоксических тренировок; проведение сравнительного анализа их эффективности и безопасности применения; изучение физиологических, биохимических и молекулярных механизмов их действия; поиск возможности их оптимизации.

Изучение этих вопросов, однако, проводится на совершенно новом методическом уровне. Главное внимание сосредоточено на изучении молекулярных, сигнальных геном-зависимых механизмов адаптации, их соподчиненности, взаимодействия и взаимовлияния на разных стадиях процесса, их роли в формировании функционального ответа, а также на поиске молекулярных мишеней терапевтического воздействия. Показателем широкого международного интереса специалистов к этим вопросам являются изданные в США монографические сборники, в которых принимали участие и русские ученые: «Intermittent Hypoxia. From Molecular Mechanisms to Clinical Applications» (2010) и «Intermittent Hypoxia and Human Diseases» (2012).

Особенностью адаптации к гипоксии является тот факт, что главный фактор этого процесса – кислород – включается в метаболизм аэробных организмов и активно потребляется ими в качестве жизненно необходимого субстрата. Кислород-зависимые процессы биологического окисления, ответственные за образование энергии, являются ведущим метаболическим звеном, определяющим исключительно высокую чувствительность высших организмов к дефициту энергии. Стабильность этого звена у эукариот обеспечивается сложнейшим регуляторным механизмом – **кислородным гомеостазом**, осуществляемым на системном, органном и клеточно-молекулярном уровнях. Его целью является поддержание условий функционирования окислительных ферментов и синтеза энергии, а также всех без исключения энергозависимых процессов – ионной асимметрии, возбудимости мембран, осмотического давления, теплообразования, сократительной функции, синтетических процессов и прежде всего синтеза белков, секреции и пр. Нарушение кислородного гомеостаза приводит к возникновению многих заболеваний, поскольку любое патологическое состояние прямо или косвенно связано с нарушением кислородного режима организма и его регуляции.

Аэробный энергетический обмен является мишенью для гипоксии. Нарушение доставки кислорода в клетку при гипоксии и снижение синтеза энергии в этих условиях, приводящее к уменьшению уровня внутриклеточного АТФ ниже физиологической нормы и сопряженному подавлению энергозависимых процессов, лежит в основе мультисистемности и полиорганности функционально-метаболических нарушений, характерных для гипоксии. Признаки угнетения наиболее значимых энергозависимых функционально-метаболических процессов появляются при снижении внутриклеточного содержания АТФ на 10-20%, а при падении уровня АТФ на 30% наблюдается их полное подавление. Все это имеет принципиальное значение для жизнедеятельности клетки в условиях дефицита кислорода.

Аэробный синтез энергии осуществляется в клетке с помощью сложнейшей ферментной системы – митохондриальной дыхательной цепи, которая вовлекается в процесс регуляции кислородного гомеостаза, выполняя при этом сигнальную роль модулятора потребления кислорода, скорости его поступления из внеклеточной среды, а также активатора защитных антигипоксических реакций организма, индуцируемых как на системном, так и на клеточно-молекулярном уровнях. Технический прогресс и методические инновации в области клеточной и молекулярной биологии открыли новые возможности для изучения взаимодействия структуры и функции различных внутриклеточных систем, что неизбежно повлияло на многие традиционно сложившиеся о них представления. Это касается, в первую очередь, митохондрии, которая на протяжении полувека рассматривалась главным образом как энергетическая силовая станция клетки. Тем не менее, благодаря исследованиям последних двух-трех десятилетий стало очевидным, что митохондрии участвуют не только в *аэробном синтезе энергии*, но и в важнейших регуляторных процессах, определяющих внутриклеточные, межклеточные и системные взаимодействия и вовлекаются не только во *внутриклеточную*, но и в *системную регуляцию*.

Более того, митохондриальная дыхательная цепь не только принимает непосредственное участие в сложнейшей системе внутриклеточной и межклеточной сигнализации, но в условиях гипоксии участвует в формировании как ранних, так и поздних адаптивных факторов, благодаря чему обеспечивается формирование системного ответа организма на дефицит кислорода (Лукьянова, 1997, 2000, 2002, 2004, 2008, 2011; Acker, 1994; Lukyanova, 1997, 2004, 2013, 2014; Lutz, Prentis, 2002; Michiels, 2004; Seppet E. et al., 2009; Wenger, 2000).

Все это делает проблему регуляции энергетического обмена в условиях гипоксии, а также поддержания и сохранения в этих условиях кислородно-энергетического гомеостаза в клетке и на уровне организма исключительно актуальной и требует изучения и понимания механизмов его нарушения. Следует отметить, что в зарубежной литературе этот вопрос разработан недостаточно. Он ограничен, в основном, исследованиями в области тяжелых гипоксических воздействий, граничащих с аноксией. Систематические исследования в широком диапазоне концентраций кислорода отсутствуют.

В связи с этим остаются нерешенными целый ряд проблемных вопросов, имеющих принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов реакции клетки на дефицит кислорода: 1) Какова роль митохондрий и энергетического обмена в клеточном и системном сигналинге; 2) Каким образом осуществляется сенсорная функция митохондриальной дыхательной цепи по отношению к кислороду и какова ее роль в механизмах формирования срочной и долговременной адаптации к гипоксии; 3) Какова зависимость этих процессов от характера гипоксических воздействий (их силы, длительности, режимных особенностей), каковы оптимальные условия для их формирования, какими функционально-метаболическими параметрами они описываются; какими параметрами диагностируется зона риска; 4) Каковы молекулярные механизмы тканеспецифических особенностей реагирования на гипоксию индивидуумов с различной толерантностью к ней; 5) Каковы механизмы взаимодействия ми-

тохондрий с другими сигнальными системами при формировании срочной и долговременной адаптации; 6) Каковы подходы создания энерготропных (антигипоксических) средств, ускоряющих и облегчающих формирования срочных и долгосрочных механизмов адаптации к гипоксии.

Все эти вопросы на протяжении последних 45 лет исследовались коллективом лаборатории биоэнергетики и проблем гипоксии.

Автору монографии посчастливилось контактировать и взаимодействовать в этот период с ведущими учеными, занимающимися проблемами кислород-дефицитных состояний, системных и молекулярных механизмов адаптации, а также создания антигипоксических средств: Агаджаняном Н.Н., Архипенко Ю.В., Березовским В.А., Боголеповым Н.Н., Вальдманом А.В., Ворониной Т.А., Газенко О.Г., Гольдбергом Е.Д., Ещенко Н.Д., Коваленко Е.А., Колчинской А.З., Кондрашовой М.Н., Маевским Е.И., Миррахимовым М.М., Меерсоном Ф.З., Морозом В.В., Рябовым Г.А., Самойловым М.О., Селивановым Е.А., Середениным С.Б., Скворцовой В.И., Стрелковым Р. Б., Сухоруковым С.В., Хватовой Е.М., Чижовым А. Я., Hochachka P.W., Siesjo B.K. Огромная им благодарность за это.

Последние 18 лет экспериментальная работа успешно проводилась в стенах НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Итогам этих исследований и современному видению роли митохондрий в клеточном сигналинге в условиях гипоксии посвящена данная монография.

Автор приносит глубокую благодарность своим коллегам и друзьям – сотрудникам лаборатории биоэнергетики и проблем гипоксии, соратникам и единомышленникам, на протяжении многих лет плодотворно и успешно работавших над проблемами сигнальной функции митохондрий при гипоксии: Уголеву А.Т., Чернобаевой Г.Н., Романовой В.Е., Германовой Э.Л., Дудченко А.М., Балмуханову Б.С., Корнееву А.А., Поповой О.А., Харадузову С.В., Белосусовой В.В., Курлаеву С.Н., Сеилханову С.К., Макаренко Т.В., Кировой Ю.И. и др. Результаты их исследований, не обесцененных временем и сохранивших до настоящего времени свою актуальность, способствовали разработке концепции ведущей регуляторной роли митохондрий в ответной реакции на гипоксию и в формировании клеточно-системной адаптации к гипоксии.

Лукьянова Людмила Дмитриевна,
член-корр. РАН, профессор, д.б.н.,
аслуженный деятель науки РФ,
Почетный Президент международного
об-ва Адаптационной медицины (ISAM),
ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии. Москва

Глава I РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТОЧНОМ СИГНАЛИНГЕ

1.1 Митохондрии: исторические аспекты

Митохондрии, в которых осуществляется аэробный синтез АТФ – это уникальные двухмембранные цитоплазматические органеллы, характерные для эукариот*, т. е. организмов, клетки которых содержат оформленные, ограниченные оболочкой ядра.

Впервые митохондрии были обнаружены в мышцах насекомых Р. Келликером в 1850 г. Однако вплоть до 90 гг. XIX в. их считали органеллой, характерной только для мышечной ткани. Как структурные полиморфные (нитевидные и грануловидные) внутриклеточные образования мембранной природы – они были описаны Флеммингом В. (1888) и названы им биобластами. Год спустя Бенда К. (1889) присвоил им термин *митохондрии* (*mito* – нитевидный, *khóndrion* – гранула, так как в световом микроскопе органеллы выглядят как нитевидные гранулы), хотя этот термин стал применяться в научной литературе значительно позже. В тот ранний период митохондрии называли «хондриосомами», «хондриомитами», «платосомами». В 1890 г. Альтман Р. предложил первый гистохимический способ их выявления и впоследствии подробно исследовал их в различных клетках. Наблюдавшаяся Альтманом автономность митохондрий и их способность к делению, а также открытое в начале XX в. явление цитоплазматической наследственности дали основание считать, что эта органелла способна к самовоспроизведению и содержит цитоплазматические гены.

Современные представления о функциональной роли митохондрий в клетке формировались очень медленно, что было обусловлено прежде всего методическими причинами – невозможностью проведения биохимических исследований их свойств, так как изолированные митохондрии были получены Клодом А. только в 1946 г. Тем не менее, в 1898 г. Михаэлис Л. показал наличие окислительно-восстановительной активности цитозоля клетки, а Варбург А. в 1913 г. – способность определенных компонентов цитоплазмы потреблять кислород.

В 1912 г. Кингсбери Б.Ф. высказал предположение, что митохондрии могут быть респираторными центрами клетки. В 1925 г. Варбург О. обнаружил в клетке наличие цитохромов – железосодержащих геминных белков – и установил их участие в окислительно-восстановительных реакциях за счет меняющейся валентности железа. Долгое время после этого цитохромоксидаза носила название «дыхательный фермент Варбурга».

В 1932-1934 гг. Энгельгардт В.А. открыл процесс окислительного фосфорилирования (ОФ) в мышцах, доказав, что синтез АТФ сопряжен с фосфорилированием, а его сотрудники Цыбакова Е.Т. и Белицер В.А. (1932-1939) показали, что ОФ происходит не в цикле ди- и трикарбоновых кислот (ЦТК), а при переносе электронов от окисляющегося вещества на кислород через промежуточные переносчики электронов, входящих в дыхательную цепь. При этом синтез АТФ сопряжен с дыханием. К такому же

выводу пришел и Калькар Г.М. (1939). Доказательства локализации этого процесса в митохондриях, которые служат местом генерирования энергии, были получены только в 1949 г. Кеннеди и Ленинджером.

С этого момента начинается бурно развивающийся этап исследований митохондрий как органелл, специфически связанных с утилизацией кислорода и аэробным образованием энергии в клетке, гораздо более экономным, нежели анаэробный гликолиз. Это и положило начало новому направлению в биологии – *биоэнергетике*. В короткий срок были открыты осмотическая, сократительная, регуляторная и генетическая функции митохондрий и найдены многие из тех молекулярных структур, которые служат первичным субстратом этих функций. Было показано также, что митохондрии обеспечивают интеграцию многочисленных процессов клеточного обмена. Первый этап этих исследований связан с именами А. Ленинджера, Б. Чанса, Э. Слейтера, Л. Эрнстера, Ф. Сикевитца и др. Последний назвал митохондрии силовой станцией клетки, и за ними закрепилось представление, как об основном внутриклеточном «энергетическом реакторе» (1957). Кульминационной точкой этого этапа была «хемиосмотическая революция», произведенная хемиосмотической гипотезой работы дыхательной цепи (Mitchell P., 1961).

Таким образом, начиная с 50-х годов XX столетия и в последующие полвека интересы митохондриологов были направлены на изучение мембранных механизмов энергосинтезирующей функции митохондрий. Митохондрия рассматривалась главным образом как уникальная самодостаточная структура, работающая независимо от центральной регуляции и использующая кислород для генерации энергии в виде АТФ и митохондриального мембранного потенциала. Однако к концу XX столетия стали постепенно накапливаться результаты, свидетельствующие о тесном взаимодействии митохондрий не только с огромным количеством внутриклеточных процессов, но и их участии в межклеточных взаимодействиях и регуляторных процессах, происходящих на системном уровне.

* К *эукариотам* относятся все одноклеточные (кроме бактерий) и многоклеточные организмы (клетки растений, животных, грибов и протистов), имеющие ядро, окружённое двойной мембраной. Основная часть генетического материала эукариотической клетки находится в ядре и представлена ДНК, связанной с белками, и обычно не образует кольцевидной структуры. На определённом этапе *клеточного цикла* генетический материал ядра преобразуется в *хромосомы*. Цитоплазма эукариотической клетки сложна организована. Она имеет цитоскелет, построенный из актиновых, миозиновых, тубулиновых, динеиновых микрофиламентов и из микротрубочек, обеспечивающий перемещение в цитоплазме органелл и везикул разной природы, все процессы, связанные с эндоцитозом (фагоцитоз, пиноцитоз) и экзоцитозом (транспорт заключённых в мембранные пузырьки веществ из клетки наружу), амёбoidное и иные способы клеточного движения. Для клеток эукариот, независимо от их положения на эволюционной лестнице, характерна также компартментализация: наличие органелл, к которым, помимо ядра, относятся митохондрии, хлоропласты, комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум, лизосомы и др., выполняющие энергетические, пищеварительные, выделительные и др. функции. Делится эукариотическая клетка путём *митоза*.

К *прокариотам* (*доядерные*) относятся клетки эубактерий и архебактерий. Прокариотическая клетка имеет очень небольшие размеры и кольцевую ДНК, которая не окружена ядерной мембраной и располагается в так называемой ядерной области – нуклеоиде. У большинства прокариот нет внутренних мембранных органоидов. Органеллы типа митохондрий и хлоропластов у них отсутствуют.

Вместе с тем стало очевидным, что митохондрии принципиально отличаются от всех других внутриклеточных органелл тремя свойствами, определившими их исключительное положение в клетке:

1) Наличием во внутренней мембране митохондрий **системы аэробного синтеза энергии** – электрон-транспортной дыхательной цепи (система трансмембранных белков – ферментов и переносчиков электронов, передающих электроны от субстратов на кислород и организованных в четыре ферментных и АТФ-азного комплексов в соответствии с возрастанием окислительно-восстановительного потенциала).

2) Наличием **собственного генома**, что позволяет независимо от генома ядра обновлять в условиях высоких функциональных нагрузок наиболее функционально значимые белки, входящие в состав ферментных комплексов дыхательной цепи.

3) Способностью к подвижности (**митохондриальная динамика**): фрагментации (делению), слиянию, метафагии и перемещению в клетке.

В настоящее время ни у кого не вызывает сомнений, что митохондрии играют ключевую роль в *энергетическом обмене*. Однако наряду с этим получил признание и тот факт, что митохондрии являются не только главным внутриклеточным источником энергии, необходимым для нормальной жизнедеятельности, но и играют *ведущую сигнальную роль в клеточном метаболизме*. С митохондриями связана организация работы многих внутриклеточных сигнальных путей, и в то же время они являются мишенью, подвергающейся модификациям во время внешних и внутренних стрессорных воздействий, при различных заболеваниях, старении и пр.

1.2 Происхождение митохондрий

Особая роль митохондрий в жизнедеятельности клетки в значительной степени связана с их происхождением. Современные варианты реконструкций происхождения митохондрий укладываются в рамки двух основных концепций: *эндосимбиотической и аутогенетической*.

Согласно *эндосимбиотической* концепции митохондрии – это эволюционный продукт симбиоза, при котором произошло слияние двух клеток: анаэробной архибактерии – «хозяина» и протеобактерии – симбионта, имеющего дыхательный аппарат (элементы цикла Кребса, дыхательную цепь и ОФ) (Маргелис, 1983; Gray et al. 1999; Margulis, 1971). Последнее способствовало резкому увеличению способности к образованию АТФ по сравнению с анаэробной утилизацией глюкозы (в 18 раз), что и положило начало происхождению эукариот. Формирование клетки эукариот могло происходить путем последовательных симбиозов нескольких прокариот (Маргелис, 1983).

Эндосимбиотическая теория происхождения митохондрий и хлоропластов начала формироваться в конце XIX–начале XX вв. В 1890 г. Альтман Р. предположил, что растительные пластиды произошли от бактерий-эндосимбионтов. К аналогичному заключению по поводу пластид пришел в 1905 году К. С. Мережковский, который предложил назвать это явление «симбио-

генезом». В 20-е годы XX столетия Б. М. Козо-Полянским было высказано предположение, что симбионтами являются и митохондрии: «...органойды клетки не являются продуктами дифференциации, но представляют результат суммирования, присоединения и внедрения со стороны перед тем автономных и ведших самостоятельное существование жизненных единиц...». В эти же годы гипотеза об эндосимбиотическом происхождении митохондрий была выдвинута американскими биологами Портье (Portier, 1918) и Иваном Валлином (Wallin, 1923). Затем долгое время в научной литературе отсутствовали упоминания о симбиогенезе. И лишь полвека спустя расширенная и конкретизированная теория получила второе рождение в работах Линн Маргулис (Маргелис) (Маргелис, 1983; Margulis, 1971). Учитывая историю вопроса, теория симбиогенеза получила имя Мережковского-Маргулис (Галактионов, 2002; Марков, 2006; Марков, Захаров, 2006).

Считается, что такой эндосимбиотический процесс в истории эволюции мог возникнуть лишь единожды (*монофилетическая* природа происхождения), около трех-четырех миллиардов лет тому назад. В этом симбиозе будущая митохондрия – симбионт –обеспечивала энергией, получаемой очень экономичным аэробным путем, клетку-хозяина, а последняя, в свою очередь, синтезировала необходимые для митохондрии метаболиты. В процессе развития таких отношений прогеноты передали множество своих генов сформировавшемуся благодаря повысившейся энергоэффективности ядру клетки-хозяина. Вот почему современные митохондрии больше не являются самостоятельными организмами. Хотя их геном кодируют компоненты собственной системы синтеза белка, многие ферменты и белки, необходимые для их функции, кодируются хромосомами, синтезируются в цитозоле клетки и только потом транспортируются в органеллы (Албертс, 1994; Галактионов, 2002; Марков, 2006; Кунин. 2014).

Основными аргументами, подкрепляющими бактериальное происхождение митохондрий, является большое сходство химического состава бактерий и митохондрий и сходство элементов биоэнергетики. Так размеры и формы митохондрий и свободно живущих аэробных бактерий совпадают. Митохондрии отличаются от всех остальных внутриклеточных органелл наличием двух полностью замкнутых мембран: *наружной и внутренней*. Липидный состав внутренней мембраны митохондрий и бактериальной плазмалеммы сходен, но сильно отличается от такового наружной мембраны митохондрий, гомологичной мембранам вакуолей эукариотических клеток.

Многие другие белки этих органелл похожи по своей первичной структуре на аналогичные белки бактерий и не похожи на соответствующие белки цитоплазмы. Кроме того, митохондрии имеют свой аппарат синтеза белка – рибосомы – и содержат, в отличие от линейных ядерных ДНК, кольцевую ДНК, не связанную с гистонами.

По нуклеотидным последовательностям рибосомные и транспортные РНК митохондрий отличаются от ядерных, демонстрируя при этом удивительное сходство с аналогичными молекулами некоторых аэробных грамотрицательных эубактерий. Кристы, образуемые внутренней митохондриальной мембраной, являются эволюционными аналогами мезосомных мембран многих прокариот. Белковый синтез в митохондриях и бактериях

подавляется одними и теми же антибиотиками, не влияющими на рибосомы эукариот. Митохондрии размножаются бинарным делением, причём делятся иногда независимо от деления клетки (Дымшиц, 2002).

Все это и ряд других свойств говорят в пользу *эндосимбиотической* теории происхождения митохондрий.

В отличие от этого и согласно *аутогенетической* концепции, эукариотная клетка произошла от единой предковой популяции (прокариотного микроорганизма). Предки эукариот в результате накопления различного рода мутаций под действием естественного отбора и совершенствования его организации постепенно эволюционировали в сложный морфо-функциональный ансамбль (Серавин, 1986 г). При этом происходили утрата простейшими одноклеточными, обладающими жесткой клеточной стенкой и внеклеточным типом питания, этой стенки; увеличение их объема; приобретение ими способности менять форму тела; появление у них способности к фагоцитозу; уход внутрь клетки участков наружной мембраны с нуклеоидом и ансамблями ферментов с последующей перестройкой для выполнения тех или иных функций (эндогенная компартментализация протоклетки), что положило начало формирования цитоскелета и клеточных компартментов – лизосом, эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи и других органелл. Предполагается, что такие сложные органоиды, как митохондрии и пластыды, ведут свое начало от имеющихся у прокариот внутривезикулярных мембранных структур трубчатого строения (Серавин, 1986 а, б, в).

Все это способствовало усовершенствованию обмена веществ и механизмов распределения питательных веществ внутри клетки. А это, в свою очередь, вело к еще большему увеличению размеров проэукариот. По мере функциональной дифференциации органелл их мембраны стали отличаться от наружной мембраны по своему белковому составу, что в конечном итоге привело к формированию присущей современной эукариотной клетке системы внутренних цитомембран и наружной плазматической мембраны.

Предполагается, что увеличение объема цитоплазмы у проэукариот привело к увеличению информационной емкости их нуклеоида. Происходило это, скорее всего, в результате умножения числа копий той единственной кольцевой молекулы ДНК, которая изначально входила в его состав (Серавин, 1986). Речь, таким образом, идет об умножении числа геномов и появлении полигеномных нуклеоидов, состоявших из двух и более одинаковых кольцевых молекул ДНК. Последнее создавало предпосылки появления и накопления мутаций и формирования генетических различий между входящими в состав полигеномного нуклеоида молекулами ДНК. Более того, в ходе эволюции этих клеток постепенно происходил переход от кольцевой к линейной структуре ДНК, установление связи с белками, в первую очередь гистонами, и в конце концов, формирование хромосом в том виде, в каком они присущи ядерному аппарату современных эукариот (Серавин, 1986).

Сравнительно недавние молекулярно-генетические исследования митохондриальных генов протистов значительно укрепили гипотезу о происхождении митохондрий от внутриклеточных симбионтов бактериальной природы.

При этом наметилось объединение представлений об аутогенетическом и симбиогенетическом путях становления эукариотной клетки в рамках единой концепции, которая является результатом некоторого консенсуса между крайними точками зрения (Галактионов, 2002; Cavalier-Smyth, 1987; de Duve, 1996; Gray et al., 1999; Lang et al., 1999). Согласно этой третьей концепции предками эукариот, действительно, были прокариотные анаэробные микроорганизмы, которые эволюционировали под действием естественного отбора. Однако с появлением фотосинтезирующих бактерий в атмосфере Земли накапливался кислород — побочный продукт их метаболизма. С ростом его концентрации, которая исходно была очень мала (0,1% O₂) (Gray et al., 1999), усложнялась жизнь анаэробных гетеротрофов, и часть из них для получения энергии перешла от бескислородного брожения к окислительному фосфорилированию. Такие аэробные гетеротрофы могли с большим КПД, чем анаэробные бактерии, расщеплять органические вещества, образующиеся в результате фотосинтеза. Судя по тому, что для всех эукариот, за немногими исключениями, характерен аэробный метаболизм, их эволюция, связанная с использованием механизма эндосимбиоза, происходила уже после накопления в атмосфере значительного количества свободного кислорода. Эта возможность и была реализована, что, несомненно, способствовало повышению конкурентоспособности проэукариот и их широкому распространению в биотопах протерозоя. Благодаря эндосимбиотическим отношениям проэукариотная клетка получила не только энергетические преимущества, но и шанс на выживание.

Приобретение эндосимбионта, способного утилизировать кислород и превращать его в нетоксичную воду, дало шанс на выживание в условиях, способствующих образованию токсичных промежуточных продуктов восстановления кислорода. Можно предположить, что многие древние анаэробы, которые не смогли адаптироваться к новым условиям, вымерли в результате кислородного холокоста (De Duve, 1996 a, b). Следовательно, митохондрии изначально были адаптированы к очень низкому рО₂, и это свойство сохранилось до настоящего времени: P₅₀ для рО₂-зависимого митохондриального потребления кислорода составляет менее 1,0 мм Hg.

В ходе эволюции бактерии-эндосимбионты превратились в полуавтономные органоиды митохондрии. Они сохранили способность синтезировать некоторые белки автономно от клетки-хозяина и способность размножаться путем деления. Однако значительная часть генетического материала митохондрий и хлоропластов переместилась в ядро. В результате эти органоиды утратили способность размножаться вне клетки-хозяина, свойственную многим симбиотическим бактериям.

В то же время, захватив гены промитохондрий, ядро получило возможность надежно контролировать функции симбионта. В ядре кодируются все белки и синтез липидов наружной мембраны митохондрий, большинство белков матрикса и внутренней мембраны органелл. Самое главное, что ядро кодирует ферменты репликации, транскрипции и трансляции ДНКмх, контролируя тем самым рост и размножение митохондрий.

1.3 Структурно-функциональные особенности митохондрий

Митохондрии имеются в большинстве клеток эукариот. Исключение составляют эритроциты млекопитающих, клетки эпителия хрусталика глаза животных и одноклеточные паразитические организмы микроспоридий, утративших митохондрии в процессе эволюции.

Митохондрии отличаются значительной вариабельностью размеров, формы и количества в клетке. Под микроскопом митохондрии, как правило, имеют вид коротких палочек или тонких нитей, но при изменении внешних условий могут быстро менять свою форму. Они бывают сферические, короткие стержневые, длинные в виде спагетти-подобных филаментов, одиночные и беспорядочно дисперсные, объединенные в комплексы или в виде разветвленных динамических сетей (Албертс и др., 1994; Солодовникова, 2007; Струков, Серов, 1995; Alberts et al., 1994, 2008; Collins, Bootman, 2003; Kuznetsov et al., 1994, 1998, 2004, 2005, 2006, 2009; Pelloux et al., 2006; Vendelin et al., 2005).

Количество митохондрий в клетке тканеспецифично и широко варьируется. Соматические ткани млекопитающих содержат примерно 250 различных типов клеток и соответственно столько же типов митохондрий. Их размеры варьируют от 1 до 10 мкм (Струков, Серов, 1995; Collins, Bootman, 2003). Количество митохондрий в клетках колеблется от нескольких десятков до нескольких тысяч. В тромбоцитах, например, содержится всего 2-6 митохондрий, в сперматозоидах – 16, в то время как в ооцитах их число достигает 100 000. В среднем на клетку приходится 500-2000 митохондрий. Их число и внутриклеточная локализация тесно связаны с функциональной активностью и энергетическими потребностями клетки. У млекопитающих они занимают около 20% объема клетки, но при интенсивном аэробном обмене (скелетные мышцы, печень, мозг, сердце) они могут составлять до 40-60% и более клеточного объема, что примерно равно объему цитоплазмы (54%) и существенно больше объема других органелл (эндоплазматический ретикулум составляет 9%, ядро и аппарат Гольджи – по 6%, пероксисом, лизосом и эндосом – по 1% от клеточного объема). Так например, в колбачках фоторецепторов митохондрии занимают 80% от объема клетки.

Наличие большого количества мелких митохондрий предполагает повышенный биогенез этих органелл. Мелкие митохондрии более активны и вовлечены в физиологически необходимый процесс обновления их популяции в клетке, контролируемый митохондриальной динамикой (биогенезом, митофагией, слиянием и делением) (Струков, 1995; Benard, Karbowski 2009; Chan, 2006; Chen H., Chan, 2005, 2009; Chen Y., Liu , Dorn, 2011; Liesa M, 2009; Karbowski, Youle, 2003; Wiesner et al. 1996).

Увеличение числа митохондрий наблюдается при гипертрофии, пролиферации и трансформации клеток, особенно после повреждения ткани. При этом усиливается процесс ОФ. Уменьшение числа митохондрий наблюдается при старении клеток, их атрофии (Струков, Серов, 1995).

Общий объем митохондрий также меняется в довольно широких пределах в ответ на изменения состава окружающей среды и внешние воздействия (Бакеева, Ясайтис, 1972; Bakeeva et al. 1972; Hackenbrock, 1968; Green et al, 1966, 1969; Wiliams et al, 1970).

Митохондрии располагаются в клетке в тех местах, где расходуется много энергии. Например, в сперматозоидах они выстраиваются вдоль жгутика, в мышечных волокнах – локализируются рядом с миофибриллами, в эпителии почечных канальцев – концентрируются в базальной части клеток у плазмолеммы, где интенсивно работают мембранные насосы. При этом существует связь между изменениями в морфологии митохондрий и состоянием дыхательной цепи, отмеченная впервые Хакенброком (Hackenbrock, 1969). Позже Грин (Green, 1969) ввел понятия: энергизованное, деэнергизованное, агрегированное, ортодоксальное состояния ультраструктуры митохондрий.

Исследования ультраструктуры митохондрий были начаты в пятидесятые годы прошлого столетия (Palade 1952-1956; Shöstrand, 1953-1956). При этом было показано, что митохондрии во всех исследованных клетках позвоночных и беспозвоночных животных, а также растений имеют сходную ультраструктурную организацию.

Митохондрии отличаются от всех остальных внутриклеточных органелл наличием двух мембран: *наружной и внутренней*, толщиной по 7 нм, между которыми имеется межмембранное пространство шириной 10-20 нм. Структуру внешней мембраны полностью кодируют ядерные гены, а структуру внутренней определяет также и ДНК самих митохондрий (ДНКмх). Внутренняя мембрана ограничивает митохондриальный *матрикс (митоплазму)*.

Мембраны состоят в основном из белков и липидов, являющихся, тем не менее, единой функциональной системой. Белки отвечают за организацию мультикаталитической активности органелл, а липиды – за создание селективного проницаемого барьера. Различные митохондриальные ферменты либо структурно связаны с одной из митохондриальных мембран, либо растворены в одном из водных пространств, образованных двухслойной структурой митохондриальной мембраны.

Наружная и внутренняя мембраны митохондрий значительно различаются по физическим свойствам. При изменении осмотического давления наружная мембрана способна только расширяться, в то время как внутренняя мембрана может и расширяться, и сжиматься. Наружная мембрана отличается также неспецифической проницаемостью, тогда как внутренняя специфична в отношении активного транспорта веществ.

Наружная мембрана митохондрий имеет большое сходство с плазматической мембраной клетки. Это относительно гладкая структура, не образует впячиваний и складок. На наружную мембрану приходится около 7 % от площади поверхности всех мембран клеточных органелл. Она состоит из билипидного слоя и пронизывающих его белков (менее 20 % по весу) при соотношении липидов и белков по массе – примерно 1:1. Особую роль играет *митохондриальный порин VDAC* (voltage-dependent anion channel) – каналообразующий белок: он формирует в наружной мембране поры диаметром 2-3 нм (гидрофильные каналы), через которые могут проникать молекулы и ионы массой до 5 000 Да, в том числе и белки (Ernster, Schatz, 1981; Mishara, 2014, 2016; Pernas, 2016; Zhang, 2010). Более крупные молекулы могут пересекать наружную мембрану только посредством активного транспорта, с помощью фермента транслоказы. С наружной мембраной митохондрий связаны ферменты липидного обме-

на, компоненты системы транслокации белков, белки, контролирующие форму митохондрий, а также белки-регуляторы апоптоза, ацил-СоА-синтаза, монооксигеназы, моноаминоксидаза, цитохром ν_5 -редуктаза, кинуренин-гидроксилаза, Со-А-лигаза жирных кислот, фосфолипаза A_2 .

Наружная мембрана митохондрий может взаимодействовать с мембраной эндоплазматического ретикулума (*ассоциированная с митохондриями мембрана эндоплазматического ретикулума* – МММ). Это играет важную роль в транспорте липидов и ионов кальция.

Внутренняя митохондриальная мембрана имеет структуру, сходную с бактериальной мембраной. Это уникальное образование, отличающееся от наружной по химическому составу. Содержание белка (транспортные белки, ферменты дыхательной цепи, а также крупные АТФ-синтазные комплексы) во внутренней мембране столь высоко (около 75% по весу), что в ней местами нарушается типичное для биомембран взаимное расположение липидов и белков, причем липиды не образуют бимолекулярного слоя, локализуясь на поверхности. Липиды внутренней мембраны отличаются высоким содержанием насыщенных жирных кислот и холестерина. Более 10% всех фосфолипидов внутренней мембраны составляет *кардиолипин*, делающий мембрану абсолютно непроницаемой для протонов. Это определяет ее высокоселективную проницаемость даже для незаряженных частиц с низкой молекулярной массой (около 100-150 Да) и разного рода ионов. Внутренняя митохондриальная мембрана содержит белки, ответственные за такие важнейшие функции, как реакции ОФ (белки электронной транспортной цепи); генерация АТФ в АТФ-синтазной реакции; регуляция межмембранного транспорта метаболитов; энергозависимая система импорта белков; процессы митохондриального слияния и деления.

Внутренняя мембрана образует многочисленные глубокие впячивания, обращенные в матрикс – *кристы*, разделяющие внутримембранное пространство на сообщающиеся отсеки (Palade, 1956; Tilokani et al., 2018). Благодаря этому общая поверхность внутренней мембраны в несколько раз превышает поверхность наружной мембраны. Ориентация крист по отношению к центральной оси митохондрии может быть различной. Наиболее часто встречается поперечная ориентация крист. Она характерна, например, для клеток печени и почек. В клетках сердечной мышцы, однако, кристы ориентированы вдоль оси митохондрий. В некоторых клетках кристы могут располагаться без определенной ориентации, их концы могут формировать дополнительные выросты. Мелкие митохондрии имеют шаровидную форму, их немногочисленные кристы ориентированы радиально.

Число крист в митохондриях является маркером их функциональной активности и отражает площадь распределения дыхательных комплексов и интенсивность протекающего в них ОФ (Струков, Серов, 1995; Wiesner 1996). Так, например, сильно складчатые ламеллярные кристы с обширной площадью поверхности характерны для интенсивно дышащих тканей, таких как мышечная и нервная. Увеличение числа крист митохондрий – свидетельство возрастающих функциональных потребностей клетки; уменьшение их числа либо их деформация встречаются при пониженной активности митохондрий. Плотные митохондрии – функционально более

активные (высокоэнергизованные). Просветленные митохондрии – низкоэнергизованные (Иванченко, Твердохлеб, 2014; Павлик и др., 2017; Струков, Серов, 1995; Твердохлеб, 1998).

Количество и размеры крист варьируют в зависимости от типа клетки, ее функционального состояния и активности энергетического обмена. Так, в митохондриях кардиомиоцитов крист втрое больше, чем в митохондриях печени. При выходе цитохрома *c* – маркера апоптоза – из внутренней мембраны кристы подвергаются реконструкции (Pernas, Scorrano, 2016; Petronilli et al., 2001).

Согласно современным представлениям, кристы соединяются с наружной мембраной соединительными каналами, по которым происходит регулируемый транспорт веществ. Внутренняя мембрана митохондрии в отличие от внешней не имеет специальных пор для транспорта мелких молекул и ионов.

На внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрии обнаруживаются многочисленные *грибовидные тельца*. Открытие этих грибовидных субъединиц принадлежит Фернандес-Морану (Fernandes-Moran, 1962). Они имеют головку диаметром 8 нм и прикреплены к мембране ножкой. Грибовидные тельца равномерно покрывают поверхность крист, причем расстояние между соседними структурами составляет около 10 нм. Головки грибовидных телец состоят из 5 различных белковых субъединиц и проявляют АТФ-азную активность. Ножка грибовидных телец является встроенным в мембрану протонным каналом. Полный супрамолекулярный комплекс грибовидных телец, включающий как головку, так и ножку, обладает АТФ-синтазной активностью (Рэкер, 1967). Развитие системы крист приводит к увеличению поверхности внутренней митохондриальной мембраны, росту числа грибовидных телец и усилению энергетической функции митохондрии.

Наружная и внутренняя мембраны в некоторых местах сближены или соприкасаются. Там находится специальный белок-рецептор, способствующий энергозависимому транспорту закодированных в ядре белков в матрикс митохондрии, включая белки TIM (translocase of inner membrane) и TOM (translocase of outer membrane) (Hackenbrock, Miller, 1975; Klug, 1974; Knoll, Brdiczka, 1982).

В местах сближения мембран может также образоваться пора, изменяющая проницаемость мембраны, – РТР (permeability transition pore). РТР включает в себя несколько белков: VDAC (порин), ANT (adenine nucleotide translocator), циклофилин D и периферийный бензодиазепиновый рецептор. РТР образуется при различных нарушениях функционирования митохондрий. Проницаемость РТР регулируется белками семейства Bcl-2. (Bolter et al., 2001; Lemeshko, 2002). Наличие контактов между наружной и внутренней митохондриальными мембранами определяется функциональным состоянием митохондрий (Hackenbrock, Miller, 1975; Knoll, Brdiczka, 1982).

Между наружной ой и внутренней мембранами находится *межмембранное (или перимитохондриальное) пространство*. Оно имеет ширину 10-20 нм. Так как наружная мембрана митохондрии проницаема для небольших молекул и ионов, по составу его содержимое сходно с содержимым цитозоля. В то же время межмембранное пространство является компартментом, благодаря которому растворимые ферменты (например, аденилаткиназа, креа-

тинкиназа и др.) не смешиваются с содержимым цитозоля, но могут вступать во взаимодействие со своими субстратами – АТФ, АДФ, АМФ. В нем также есть несколько ферментов, использующих поступающий из матрикса АТФ для фосфорилирования других нуклеотидов. Одним из белков, содержащихся в периплазматическом пространстве, является цитохром *c* (цит *c*) – компонент дыхательной цепи митохондрий.

Матрикс митохондрий, ограниченный внутренней митохондриальной мембраной, при малом увеличении электронного микроскопа выглядит однородным. При большем увеличении в нем обнаруживаются фибриллы диаметром около 2 нм, мелкие гранулы величиной 15-20 нм и более крупные гранулы величиной 20-40 нм. Фибриллы матрикса идентифицированы как молекулы ДНКмх. Мелкие гранулы представляют собой митохондриальные рибосомы. У млекопитающих они относятся к 55S-рибосомам (минирибосомам). Крупные гранулы состоят из отложений солей кальция и магния.

Селективная проницаемость внутренней митохондриальной мембраны позволяет поддерживать иной состав среды в матриксе сравнительно с цитозолем. Среда матрикса является идеальным осмометром, подчиняющимся закону Генри: матриксное пространство сокращается при уменьшении концентрации осмотически активных веществ во внутренней среде и, наоборот, при увеличении их концентрации наблюдается его набухание. Содержимое матрикса – это прежде всего ферменты, участвующие в предварительной деградации энергетических субстратов и подготовке их к последующим окислительным превращениям в дыхательной цепи (ферменты ЦТК) и связанные с ними метаболические пути, а также ферменты окисления синтеза жирных кислот, нуклеиновых кислот и белкового обмена, синтеза мочевой кислоты, аминотрансферазы и некоторые др. Катализируемые ими реакции протекают без участия кислорода. ЦТК занимает особое положение во всех системах метаболических превращений, так как практически любое вещество может окислиться до CO_2 и H_2O , если оно превратилось в одно из соединений этого цикла. Кроме того, матрикс содержит 5-6 копий ДНКмх, митохондриальные рибосомы, РНК и ферменты, участвующие в экспрессии митохондриального генома (Alberts et al., 2008).

1.4 Митохондриальная дыхательная цепь

Энергетический обмен, необходимый для реализации разных энергозависимых функций (механической, химической, осмотической, электрической), является ведущим метаболическим звеном в жизнедеятельности клетки. Без снабжения энергией, вырабатываемой в митохондриях в виде АТФ, невозможна была бы эволюция высших животных.

Группа ферментов и белков, локализованная во внутренней мембране митохондрий, находящихся в термодинамическом равновесии и выполняющих функцию окислительно-восстановительных переносчиков протонов и электронов, необходимых для биотрансформации энергии, получила название *митохондриальной дыхательной цепи* (рис. 1-2). Главная ее функция – *окислительное фосфорилирование (ОФ)* – фундаментальная метаболическая реакция, сопряженная

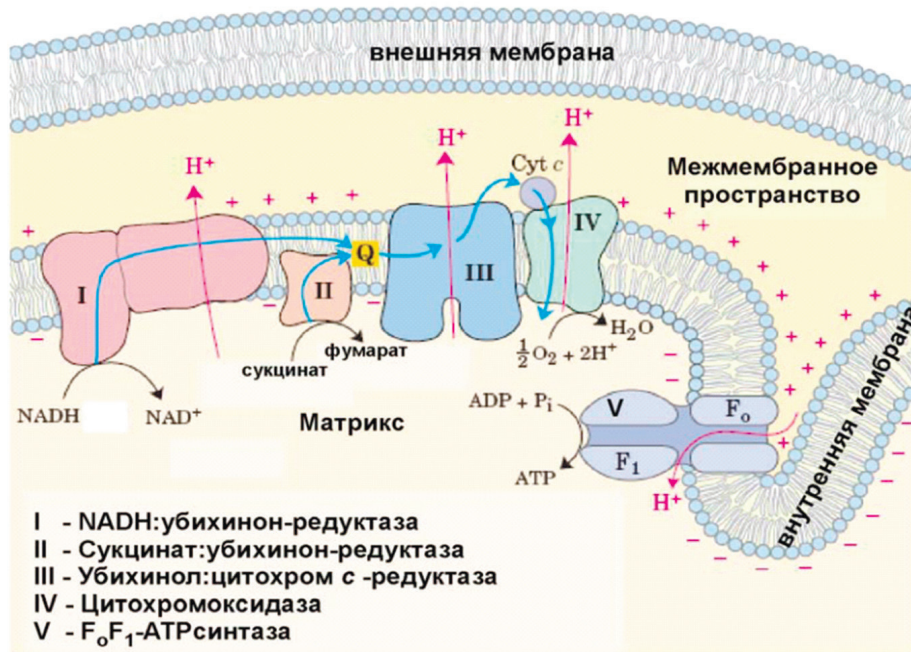


Рисунок 1 – Схема окислительного фосфорилирования во внутренней мембране митохондрий (по Alberts., Bray., Lewis et all. 1994) (модифицировано)

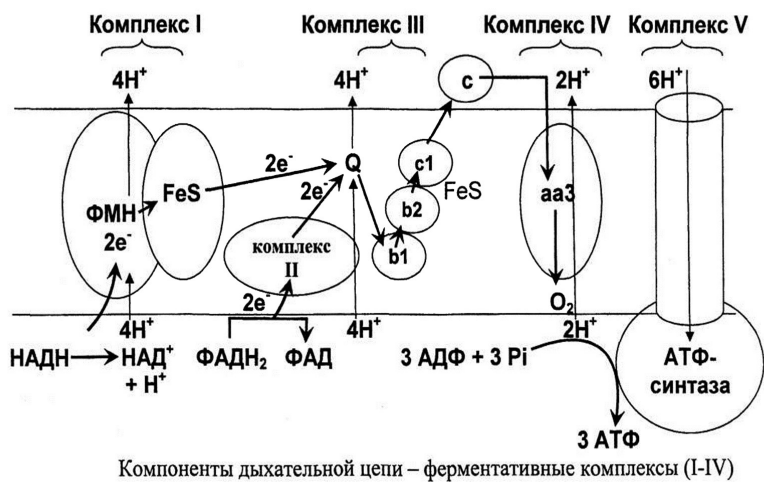


Рисунок 2 – Схема компонентов дыхательной цепи ферментных комплексов

с окислением субстратов дыхания и восстановительных эквивалентов в виде НАДН и ФАДН₂. При их окислении на внутренней мембране митохондрий образуется электрохимический потенциал, который используется АТФ-синтазой для синтеза молекулы АТФ – источника энергии в доступной для клетки форме.

Структура всех компонентов системы окислительного фосфорилирования (ОХРНOS) митохондрий на сегодняшний день хорошо изучена. Тем не менее, представление о ее нативной организации находится в постоянном развитии. Система ОХРНOS включает пять белковых комплексов, каждый из которых состоит из многих ферментов (функциональные субъединицы комплексов). У эукариот электроны переносятся по дыхательной цепи через митохондриальный ферментный комплекс I (МФК I) (*НАДН-убихинон-редуктаза*), либо через митохондриальный ферментный комплекс II (МФК II, *сукцинат-убихинон-редуктаза*), а затем последовательно – на интегральный мембранный переносчик электронов – CoQ, митохондриальный ферментный комплекс III (МФК III – *цитохром-с-редуктаза*), переносчик электронов (цит c) и, наконец, через митохондриальный ферментный комплекс IV (МФК IV – *цитохром-с-оксидаза*) на молекулярный кислород (Hatefi, 1985; Lenaz, Genova, 2010; Moser et al., 2006). Каждый ферментный комплекс катализирует отдельную стадию процесса.

Энергия, высвобождаемая потоком электронов в результате окисления субстратов дыхания, используется для переноса протонов из матрикса в межмембранное пространство комплексами I, III и IV (von Ballmoos, 2009; Belevich, Verkhovsky, 2008; Hunte et al., 2003; Zickermann et al., 2008). Это создает электрохимическую разницу потенциалов (Ψ_p , протонный градиент) по обе стороны внутренней мембраны.

Энергия, запасенная в виде Ψ_p , используется МФК V (F_1F_o -АТФ-синтаза). По мере обратного транспорта протонов в матрикс через протонный канал (F_o -субъединица АТФ-синтазы) происходит фосфорилирование АДФ неорганическим фосфатом с образованием молекулы АТФ – источника энергии в доступной для клетки форме. Таким образом, процесс окисления субстрата и восстановления кислорода сопряжен с образованием АТФ.

Начиная с 50-десятых годов XX века, когда дыхательные белковые комплексы митохондрий были впервые выделены, начались исследования не только их молекулярной, но и надмолекулярной структуры.

Первоначально предполагалось, что комплексы в виде супрамолекулярных агрегатов плотно упакованы и погружены в мембрану в упорядоченной последовательности, благодаря чему дыхательные ферменты существуют как функциональная дыхательная единица (**«цельная» или «твердая модель» – «solid state model»**) (рис. 3А) (Chance, Williams, 1955a, b, 1956; Green, Tzagoloff, 1966; Green, Baum, 1969; Keilin, Hartree, 1947). Это гарантирует высокую эффективность транспорта электронов.

Позднее появилась альтернативная гипотеза, согласно которой комплексы существуют в мембране независимо друг от друга и связь между ними осуществляется за счет свободной диффузии переносчиков электронов – *убихинона (CoQ)* и *цит c* – и их случайных взаимодействий. При этом CoQ и *цит c* действуют как мобильные носители, которые свободно диффундируют в липидной мембране (модель случайной организации отдельных дыхательных комплексов – **«жидкостная модель» – fluid state mode**). Жидкостная модель

отражает представления о свободной диффузии переносчиков электронов между отдельными независимыми комплексами (рис. 3В) (Hackenbrock et al., 1986).

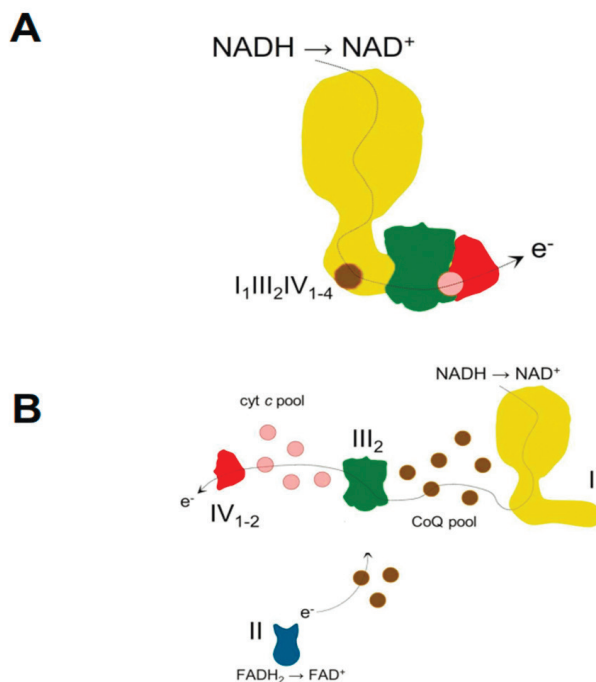


Рисунок 3 – Структурная организация митохондриальных дыхательных комплексов: А – твердая модель; В – жидкостная модель [по Maranzana , 2013].

А) «Твердая» модель (*Solid-model*). Митохондриальные комплексы I, III, IV организованы в супрамолекулярные агрегаты – **респирасомы**. Субстрат (цит *c* или CoQ) направляется непосредственно от одного фермента к следующему без диффузии в дыхательных комплексах, собранных в огромный агрегат, за исключением комплекса II, который передает электроны через убихинон сразу в комплекс III.

В) **Жидкостная модель** (*Liquid-model*). Модель случайного столкновения. Все компоненты дыхательной цепи диффузно расположены в мембране, а перенос электронов зависит от случайного столкновения четырех индивидуальных белковых комплексов и двух меньших подвижных электронных носителей, CoQ и цит *c*; рассеянных в поперечном направлении в мембране как гомоолигомеры

По мере совершенствования методических приемов, позволяющих выделять неповрежденные суперкомплексы, стало очевидным, что дыхательные комплексы организованы в более сложные динамичные надмолекулярные структуры. В 2000 году произошел возврат к представлениям о **твердой модели** («*solid state model*»). Доказывалось, что комплексы I, III и IV могут объединяться в один гигантский суперкомплекс под названием **респирасома** (*respirasome*) (Schagger, Pfeiffer , 2000). Существование респирасом было подтверждено различными независимыми группами исследователей (Acín-Pérez, 2008, 2015; Boekema, Braun, 2007; Dudkina et al., 2011; Genova, Lenaz, 2013; Lenaz, Genova, 2010; Jang , Javadov, 2018; Wittig et al. 2007).

Данные последних лет показали, что дыхательная цепь сочетает динамический набор как различных суперкомплексов, так и некоторое количество отдельных независимых друг от друга комплексов, находящихся в динамическом равновесии (*пластическая модель* супрамолекулярной организации митохондриальной дыхательной цепи) (рис. 4) (Actin-Perez, 2014; Fernández-Silva, 2013; Gu et al., 2016; Jang, Javadov, 2018; Lenaz, Tioli et al., 2018; Milenkovic et al., 2017; Signes, Fernandez-Vizarra, 2018). При этом наблюдается варьирование комбинациями закрепленных и свободных комплексов, их динамической перестановкой (динамическая ассоциация/диссоциация митохондриальных дыхательных комплексов и суперкомплексов) (Acín-Pérez et al., 2008, 2014; Dudkina et al., 2011; Lenaz et al., 2010, 2018; Vartak et al., 2013; Welchen et al., 2011). Все это позволяет модулировать эффективность переноса электронов и состояние дыхательных ферментов, оптимизировать использование доступных субстратов дыхательной цепью, регулировать различные физиологические функции, например, интенсивность ROS-сигналикации.

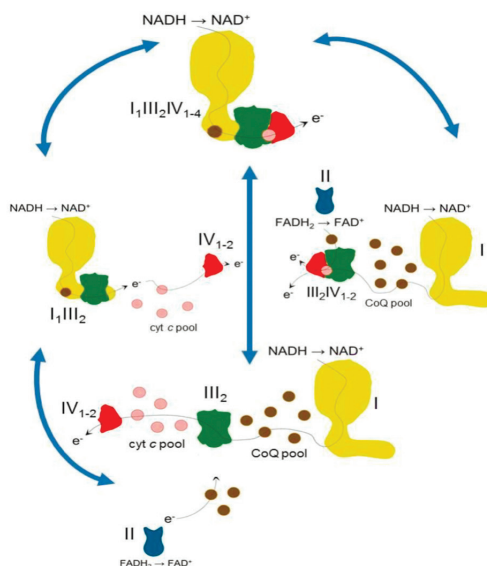


Рисунок 4 – Динамическая организация митохондриальных дыхательных комплексов. Пластическая модель (по Maranzana, 2013)

Стехиометрия суперкомплексов может быть представлена комбинацией либо 2-х комплексов, например I и III или III и IV, либо различными соотношениями 3-х комплексов – I, III и IV. Оказалось, например, что комплекс I вообще нестабилен в отсутствии комплексов III или IV. К наиболее распространенным суперкомплексам относятся комплексы I/III, I/III/IV и III/IV.

Менее ясно, существуют ли суперкомплексы, включающие МФК II. Считается, что он не входит в состав суперкомплексов и в большинстве случаев, как у растений, так и в митохондриях животных, находится в свободном состоянии. Тем не менее, имеются единичные сведения о его ассоциации с другими дыхательными ферментами электрон-транспортной дыхатель-

ной цепи митохондрий, в составе суперкомплексов I+II+III₂+IV и II+III₂+IV (Acin-Perez et al., 2008; Lenaz, Genova, 2010). Самые последние исследования позволяют предполагать вовлечение комплекса II в респирасомы I₂III₂IV₂ с образованием мегакомплекса I₂II₂III₂IV₂ (Guo et al., 2017).

АТФ-синтаза также образует димеры, которые объединяются в олигомерные структуры, располагающиеся на изгибах крист (Chaban et al., 2014; Kühlbrandt, 2015; Kühlbrandt, Davies, 2016; Wu et al., 2016). Олигомеризация АТФ-синтазы в митохондриях способствует усилению локального протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ. (Strauss, 2008).

Респирасомы в различных тканях и организмах стабильны и могут быть выделены как целые функциональные единицы без значительных повреждений. В связи с этим в настоящее время проводится поиск связующих факторов белковой и липидной природы, стабилизирующих дыхательные суперкомплексы. Оказалось, что к таким факторам относятся белки Rsf1 и Rsf2 (Chen et al., 2012), АДФ/АТФ транслокатор Aac2 (Claypool et al., 2008; Dienhart et al., 2008), стабилизирующий суперкомплекс III₂+IV₂; субъединица VIIa цитохромоксидазы (Cox7-a2l) или *supercomplex assembly factor 1* – SCAFI (Zhang et al., 2002), необходимая для сборки суперкомплекса III₂+IV в органеллах фибробластов мыши (Lapiente-Brun et al., 2013); а также кардиолипин, необходимый для прочной и эффективной ассоциации дыхательных комплексов и других мембранных белков (Genova, Lenaz, 2011, 2013, 2014; Lenaz, Genova, 2010; Lenaz et al. 2018; Milenkovic et al., 2017; Zhang et al., 2002; Strogolova et al., 2012; Wenz et al., 2009).

Функциональное значение респирасом до сих пор не совсем ясно. Предполагается, что супрамолекулярная организация суперкомплексов может усиливать каталитическую активность отдельных комплексов электрон-транспортной дыхательной цепи и эффективность переноса электронов благодаря эффекту «каннелирования» (channeling). Последнее означает прямой перенос электронов между двумя последовательными ферментами путем последовательного восстановления и повторного окисления промежуточного соединения без его диффузии в объемной среде (Jang, Javadov, 2018; Lenaz, 2018). При этом уменьшается утечка электронов и образование активных форм кислорода (АФК) в митохондриях (Maranzana et al., 2013). Кроме того, суперкомплексы могут стабилизировать целостность и сборку отдельных комплексов электрон-транспортной дыхательной цепи, регулировать ее активность и предотвращать агрегацию белков во внутренней митохондриальной мембране. Таким образом, эти структуры определяют более быстрое, стабильное и эффективное функционирование дыхательной цепи, снижают свободнорадикальную активность и повышают эффективность метаболизма. Так включение МФК IV в суперкомплекс повышает каталитическую активность МФК I и III (Schäfer et al., 2006), модифицирует конформацию других комплексов – стабилизирует работу МФК IV (Bazan et al., 2012; Jang, Javadov, 2018) Суперкомплексная сборка «динамична и организует поток электронов, оптимизирующий использование энергетических субстратов» (Lapiente-Brun et al, 2013). Организация системы ОФ митохондрий, виды и содержание суперкомплексов и индивидуальных комплексов в разных организмах различаются.

В настоящее время получены доказательства необходимости ассоциации митохондриальных комплексов в суперкомплексы и их суще-

ствования для поддержания широкого спектра функционально метаболических процессов: биосинтеза высокомолекулярных соединений, окисления жирных кислот, цикла мочевины, цикла трикарбоновых кислот, гликолиза, синтеза аскорбата и аминокислот. Объединение комплексов в единую структуру увеличивает их стабильность внутри суперкомплексов, что важно для морфологии внутренней митохондриальной мембраны и способствует увеличению количества встраивающихся в эту мембрану белков. Такая организация способствует более эффективному распределению электронов между реактивными сайтами ферментов в пределах суперкомплексов, а также препятствует образованию опасных интермедиатов реакций. Механизм взаимодействия отдельных ферментных комплексов друг с другом и их надмолекулярная организация до сих пор во многом остаются неясными.

Согласно некоторым данным, респирасомы могут быть не самой высокой формой организации дыхательных комплексов. Они могут ассоциировать и образовывать целые дыхательные участки, называемые *мегакомплексами*, (дыхательные «цепи»). Согласно этим представлениям, основу этой цепи составляет одиночный димер комплекса III (III_2), окружённый с двух боков двумя комплексами IV. Эти структурные единицы соединяются через димеризацию комплексов IV, в результате чего должна образовываться нить типа $\text{IV-IV-III}_2\text{-IV-IV-III}_2$, которая с боков плотно окружена комплексами I. Структурной единицей такой нити должен быть суперкомплекс состава $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}$ ([Lapiente-Brun et al., 2013]).

В то же время имеются данные о том, что надмолекулярная организация системы ОФ в неблагоприятных условиях претерпевает изменения и восстанавливается после возвращения в оптимальные условия. Показано, например, снижение содержания и распад ассоциаций дыхательных комплексов в условиях *гипоксии, низкого pH и аноксии* (Millar et al., 2004; Ramirez-Aguilar, Keuthe, 2011). Нарушение образования суперкомплексов способствует развитию митохондриальных болезней.

1.5 Митохондриальный геном

Молекулярно-генетические исследования митохондриальных генов значительно укрепили гипотезу о происхождении митохондрий от внутриклеточных симбионтов бактериальной природы. Они показали, что митохондрии у всех ныне живущих эукариот ведут свое начало от общего бактериального предка. Митохондрия – единственная внутриклеточная структура, кроме ядра, имеющая свой собственный геном, (собственную, как у и бактерий, кольцевую ДНК – ДНКмх) и аппарат для синтеза белков (рибосомы). В связи с передачей митохондриями в процессе эволюции ряда своих функций ядру, митохондриальный геном постепенно уменьшался. У человека он содержит 16 569 нуклеотидов: 2 гена rРНК, 22 гена tРНК и 13 генов (Дымшиц, 2002; Мазунин и др., 2010; Сологуб и др., 2009; Сухоруков, 2011; Bernaldin et al., 2004; Lang et al., 1999).

Белки, кодируемые ДНКмх, являются субъединицами комплексов дыхательной цепи. Это 7 субъединиц комплекса I (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) одна субъединица комплекса III (цит c), три субъединицы комплекса IV (ЦХО I,

II и III) и две субъединицы комплекса V (рис.5). Все остальные митохондриальные белки (около 300), в том числе и субъединицы комплекса II, кодируются ядерным геномом и импортируются в митохондрии из цитоплазмы после их синтеза на рибосомах в цитозоле. Наличие собственного генома обеспечивает митохондриям преимущества в скорости обновления функционально наиболее значимых белков ферментов дыхательной цепи.

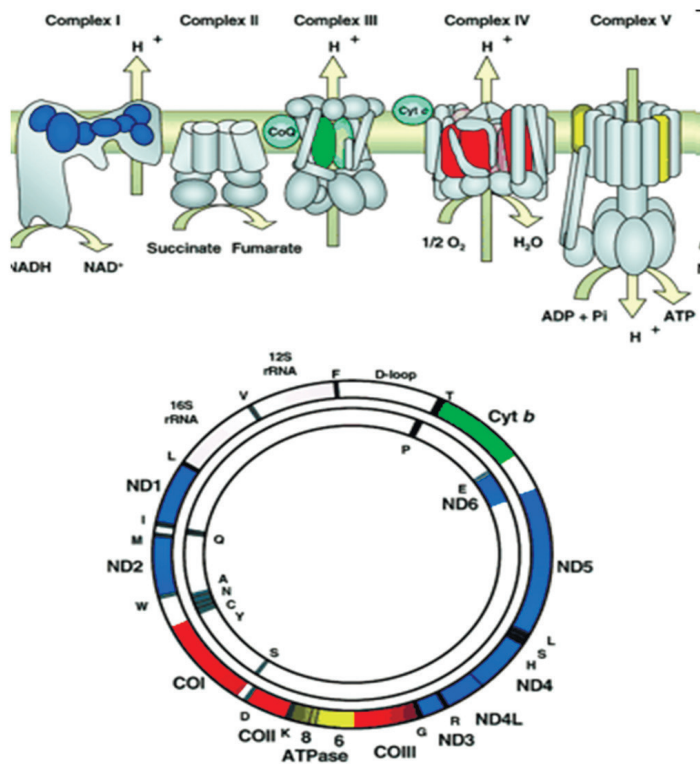


Рисунок 5 – Белки, кодируемые ДНКмх – субъединицы комплексов дыхательной цепи

В отличие от ядерной ДНКмх не обладает механизмами восстановления, которые помогают предотвратить мутации. В результате ДНКмх имеет гораздо более высокую скорость мутаций, чем ядерная ДНК. АФК, образующиеся при ОФ, также могут повредить ДНКмх.

1.6 Митохондриальная динамика и ее роль в жизнедеятельности клетки

Для митохондрий, в отличие от всех других внутриклеточных органелл, характерен *структурно-морфологический динамизм*, свидетельствующий об их высокой пластичности и *подвижности*. Этим термином обозначают изменения в морфологии и локализации митохондрий в клетке, которые обеспечиваются четырьмя процессами: *слиянием* (*fusion* – объединение двух органелл

в одну), **делением** или фрагментацией (*fission* – разделение одной органеллы на две части), **перемещением** (*movement* – направленное движение внутри клетки) и **митофагией** (*mitophagy* – целевое разрушение органелл путем аутофагии) (Chan, 2006; Chen H. et al., 2005; Chen Y. et al., 2011; Chen and Chan, 2005, 2009; Flippo, Strack, 2017; Kuznetsov, Margreiter, 2009; Kuznetsov et al., 1998, 2004 b, 2009; Liesa et al., 2009; Labbé et al., 2014; Mishra and Chan, 2014, 2016; Osellame et al., 2012). В эволюционном ряду, начиная от дрожжей и вплоть до млекопитающих, эта динамика имеет важное значение как в норме, так и при патологических состояниях (Виноградская, 2014; Орлова, 2015; Labbé et al., 2014; Mishra and Chan, 2014, 2016; Tilokani et al., 2018; Yaffe 1999).

Все эти процессы являются в высокой степени регулируемые: они неразрывно взаимосвязаны и контролируют морфологию органелл, тесно сопряженную со специфической функцией клетки, ее метаболизмом. Они необходимы для устранения поврежденной ДНКмх, митохондриального генома, обмена белков и липидов, для поддержания устойчивой структуры, развития клеток, поддержания функционально-метаболического гомеостаза и функции митохондрий. Они имеют решающее значение для многих клеточных процессов, таких как клеточный цикл, иммунитет, апоптоз и контроль качества митохондрий.

Широкая вариабельность в длине митохондрий, наблюдаемая в разных типах клеток и в разных условиях, является результатом изменений баланса между скоростями деления и слияния митохондрий, процессами, которые могут происходить очень быстро – в течение секунд (Song et al., 2009). Сдвиг равновесия в сторону слияния делает возможным образованием в клетке обширных взаимосвязанных митохондриальных сетей, тогда как сдвиг в сторону деления провоцирует производство большого количества морфологически и функционально различающихся сферических органелл. Эти процессы регулируются большим количеством белков, входящих в аппарат, контролирующий слияние и деление митохондрий, и играет важную роль в нормальной физиологии клетки. Нарушение этих функций приводит к клеточной дисфункции, неврологическим расстройствам и метаболическим заболеваниям (Виноградская, 2014; Liesa et al., 2009; McBride, 2006; Tilokani et al., 2018).

Митохондриальная динамика – относительно новое направление исследований. Однако в настоящее время оно признано наиболее значимой характеристикой не только делящихся, но и интерфазных клеток, включая высокодифференцированные клетки таких тканей, как нервная и поперечно-полосатые мышечные ткани. Этот процесс является механизмом контроля над обновлением и качеством митохондриальной популяции в течение интерфазы путем «перемешивания» ДНКмх, белков и других жизненно важных веществ этих органелл (Liesa et al., 2009; Mishra, Chan, 2016; Ono et al., 2001; Piquereau et al., 2013; Sato et al., 2006; Tilokani et al., 2018). В них вовлечено огромное количество регуляторных белков. Молекулярные механизмы этих процессов очень сложны и до настоящего времени полностью не раскрыты.

Поскольку между морфологией митохондрий и их функциональным состоянием существует тесная взаимосвязь, процессы слияния и деления формируют важный механизм клеточной адаптации и во многом определяют судьбу клетки (Сухоруков, 2011; Karbowski, Youle, 2003; Chan D., 2006).

1.6.1 Митохондриальное слияние

Это эволюционно сформировавшийся энергозависимый процесс (рис. 6). Феномен слияния митохондрий был открыт лишь в 1972 году, значительно позже, чем процесс деления, который был известен уже в конце XIX века (Орлова и др., 2015; Kimberg, Loeb, 1972; Smirnova et al., 2001; Wakabayashi, Green, 1977). Этот процесс выполняет защитную функцию, так как является механизмом контроля над обновлением и качеством митохондриальной популяции в течение интерфазы путем «перемешивания» ДНКмх, белков и других жизненно важных веществ этих органелл, пополнению состава белков, восстановлению ДНКмх и перераспределению метаболитов (Ono et al., 2001; Sato et al., 2006).

У млекопитающих при объединении двух митохондрий координированное слияние происходит в три этапа: 1) состыковка («докинг») двух отдельных органелл; 2) неэнергозависимое слияние *наружных* мембран, медируемое регуляторными белками – тремя ГТФазами надсемейства динаминов – *митофузинами*: Mfn1 и Mfn2 и Optic Atrophy 1 (Opa1); 3) энергозависимое слияние *внутренних* мембран, опосредованное ГТФазой Opa1. Эти «белки слияния» являются многофункциональными и вовлечены также в регуляцию других важных митохондриальных функций.

В клетках, которые не экспрессируют Mfn1/2, нарушается не только морфология митохондрий, но и их подвижность. Снижение уровня Mfn2 приводит к нарушению ОФ (Mishra, Chan, 2014, 2016). Отсутствие Mfn2 в клетках Пуркиньи (нейроны мозжечка) приводит к потере активности дыхательной цепи (Chen et al., 2007). Mfn2 контролирует также в митохондриях уровень CoQ (Mourier et al., 2015).

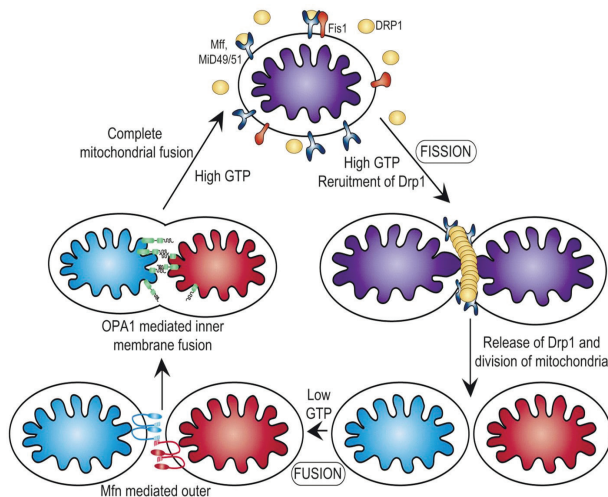


Рисунок 6 – Митохондриальная динамика, включающая деление и слияние.

Процессы деления и слияния митохондрий сбалансированы в отрегулированном состоянии (метаболический гомеостаз)

Митохондриальное *слияние* – двухступенчатый процесс, предполагающий раздельное слияние наружной и внутренней мембран. Слияние *наружной* мембраны контролируется изоформами ГТФазы митофенина (Mfn 1-Mfn2). Слияние *внутренней* мембраны происходит при высокой активности ГТФ и медируется изоформами OPA1.

Деление органелл медируется белком Drp1, который образует высокомолекулярные олигомеры на поверхности митохондрий (по Osellame et al., 2012)

Что касается Opa1, то этот белок, имеющий множественные изоформы, связывается с внешней поверхностью внутренней мембраны митохондрий и подвергается ферментативному расщеплению локализованными в межмембранном пространстве протеазами. Процесс стимулируется высоким мембранным потенциалом. При этом активируется ОФ, что способствует ГТФ-зависимому преобразованию Opa1 из длинной формы в короткую, растворимую и неактивную. (Alexander et al., 2000; Bartolák-Suki et al., 2017; Chan, 2012; Chan, 2012; Chen, Chan, 2005, 2009; Chen et al., 2005; Delettre et al., 2000; Duchen, 2012; Labbé et al., 2014; Legros et al., 2002; McBride et al., 2006; Mishra et al., 2014; Mishra, Chan D., 2016; Santel, Fuller, 2001; Suki et al., 2016; Zhao et al., 2011).

Opa1 способствует поддержанию структуры крист, что имеет решающее значение для сборки суперкомплексов дыхательной цепи. При «нокауте» этого белка кристы становятся бесформенными, а между двумя мембранами появляется значительное пространство (Cogliati et al., 2013). Удаление митофузинов и Opa1 приводит к резкому снижению содержания ДНКмх и мембранного потенциала, а также к подавлению функции дыхательной цепи в культивируемых клетках (Chen., Chan, 2005, 2009; Chen et al., 2005, 2010; Olichon et al., 2006).

Таким образом, слияние наружных мембран не зависит от ОФ, однако для слияния внутренних мембран требуется ферментативное расщепление OPA1, которое стимулируется высоким мембранным потенциалом (Караева и др., 2015; Bartolák-Suki et al., 2017; Mishra, 2014, 2016; Tilokani et al., 2018; Trewin et al., 2018). Это предполагает, что только здоровые и активные митохондрии могут сливаться должным образом. Имеются доказательства, что высокая активность OXPHOS и увеличение производства АТФ коррелирует с удлинением митохондрий (Mishra et al., 2014; Mitra et al., 2009; Tondera et al., 2009). Слияние митохондрий регулирует их количество и морфологию. Важную роль в слиянии митохондрий играет их липидный состав. Показано, например, что одновременное подавление синтеза кардиолипина и фосфатидилэтаноламина приводит к ингибированию процесса слияния митохондрий (Legros, 2002).

При слиянии митохондрии могут увеличиваться в размерах до гигантских форм (мегамитохондрии). В то же время гипертрофия митохондрий является признаком патологии.

1.6.2 Интерфазное деление митохондрий

Это процесс, противоположный слиянию, является одним из способов митохондриального биогенеза, который обеспечивает растущие энергетические потребности клетки, например, в условиях стресса или при высокой функциональной нагрузке. Феномен митохондриального деления был известен давно, и ему отводилась роль обеспечения дочерних клеток митохондриями после митоза (Kimberg, Loeb, 1972; Wakabayashi, Green, 1977). Он контролирует также качество митохондрий и ДНКмх, помогает изолировать поврежденные сегменты митохондрий (Frazier et al., 2006; Benard, Karbowski, 2009), а также митохондрии с низким мембранным потенциалом, количество которых возрастает при интенсивном делении (Twiget et al., 2008).

Деление, так же как и слияние, — энергозависимый процесс. Снижение мембранного потенциала и содержания внутриклеточного АТФ активирует

деление через повышение уровней АДФ и АМФ. При этом для активации Drp1 необходимо связывание АДФ с рецептором MiD51.

Митохондрии делятся независимо от циклов клеточного деления и в той последовательности, которая морфологически напоминает деление бактериальной клетки. Перед делением их объем увеличивается, и затем он равномерно распределяется по дочерним органеллам. При резком увеличении метаболической активности происходит увеличение числа митохондрий за счет деления.

Процесс деления, как и слияния, характеризуется тремя этапами (см. рис. 6): 1) маркировка участка деления на внешней митохондриальной мембране; 2) концентрирование цитозольного белка DRP1 на участке деления; 3) сужение мембран при делении, чтобы разделить кластер митохондрий на дочерние кластеры (Pernas, Scorrano, 2016). В клетках млекопитающих известны три основных белка, ответственных за митохондриальное деление: ГТФаза семейства динаминовых Drp1, ее рецептор – Fis1 и эндофилин B1 (Bif-1).

Деление *внешней* митохондриальной мембраны млекопитающих контролируется преимущественно цитозольным динамин-зависимым белком Drp1 (dynamin-related protein 1) (Ingelman et al., 2005; Mishra, 2016; Smirnova et al., 2001). Из цитозоля он рекрутируется на поверхность митохондрий, где закрепляется с помощью набора рецепторных белков (Mff, Fis1, MiD49 и MiD50) и концентрируется на линии будущей перетяжки (Varadi et al., 2004; De Vos et al., 2005). Олигомеры Drp1 путем ГТФ-зависимой самосборки формируют кольцо вокруг митохондрий, которое при гидролизе ГТФ сжимается и моделирует перетяжку, после чего белок постепенно диссоциирует обратно в цитозоль (Ferguson, De Camilli, 2012; Ingelman et al., 2005; Schmid, Frolov, 2011).

Поскольку Drp1 не имеет трансмембранного домена, то для его закрепления на поверхности митохондрий необходимы рецепторы. В составе наружной митохондриальной мембраны у млекопитающих обнаружено несколько Drp1-связывающих белков. Наиболее изученными являются Mff (Mitochondrial fission factor) – белок, который у человека получил название hFis1. Mff – главный кандидат на роль обязательного рецептора для Drp1. Его «нокаут» приводит к удлинению митохондрий (Gandre-Babbe, Van der Blik, 2008; Van Blik et al., 2013) и уменьшает количество Drp1 на их поверхности (Dikov, Reichert, 2011).

Известны еще два белка наружной мембраны, участвующие в локализации Drp1. Это митохондриальные динамические белки MiD49 и MiD51 (Mitochondrial dynamics proteins). Рецепторный комплекс Mid49/51 (mitochondrial elongation factor 1-MIEF1) выступает как конкурент Fis1 и Mff, который захватывает и инактивирует Drp1 (Losen et al., 2013; Zhao et al., 2011). При этом происходит связывание рецептора MiD51 с АДФ. Комплекс MiD49/51 может также взаимодействовать с Fis1. В этом случае Drp1-связывающая функция комплекса ослабляется, способствуя делению митохондрий (Palmer et al., 2011). Полагают, что активность этого комплекса зависит от физиологического состояния клетки, которое регулирует митохондриальную динамику (Dikov, Reichert, 2011; Losen et al., 2013).

Механизмы деления *внутренней* митохондриальной мембраны пока еще изучены недостаточно. Предполагаемыми участниками этого процесса является белок OPA1, участвующий в слиянии (Olichon et al., 2006), и митохондриальный белок человека MTP18 (Tondera et al., 2004; 2005). Белок эндофилин

B1 участвует в синхронизации фрагментации внешней и внутренней митохондриальных мембран. Bif-1 на другой стадии слияния участвует в поддержании нормальной митохондриальной морфологии (Cuddeback et al., 2001).

Считается, что скорости деления и слияния хорошо скоординированы и сбалансированы. Недостаток обеспечения энергией приводит к пролиферации митохондрий как к компенсаторному механизму (Сухоруков, 2011; Wiesner et. al., 1999).

1.6.3 Митофа́гия

Это еще один процесс, связанный с митохондриальной динамикой и направленный либо на регулирование внутриклеточного количества митохондрий, необходимого для поддержания метаболического баланса, либо на удаление поврежденных органелл (Lemasters, 2014). Митофагия функционирует как ранний защитный механизм против aberrантных митохондрий, которые могут нанести вред клетке, и способствует ее адаптации к стрессу. Она включает контроль качества митохондрий, селективную секвестрацию и деградацию поврежденной митохондрии до того, как активируется апоптоз. При этом происходит поглощение дефектных митохондрий специализированными везикулами (изолирующими мембранами), покрытыми аутофагосомным маркером MAP1, которые герметизируются, а затем сливаются с лизосомами для устранения захваченных органелл. В результате предотвращается дегенерация здоровых клеток (Kubli, Gustafsson, 2012; Lemasters, 2014; Youle, Narendra, 2011).

В настоящее время механизмы активации митофагии интенсивно исследуются. У млекопитающих наиболее изучен сигнальный путь, опосредованный белками PINK1 и Паркин. Сигналом для активации митофагии служит деполаризация митохондриальной мембраны, сопутствующая повреждению митохондрий (Lyamsaev et al., 2018; Skulachev, 2001, 2006). Снижение мембранного потенциала приводит к накоплению энергозависимой PTEN-индуцированной киназы 1 (PINK1), которая содержится в очень небольших количествах в интактных энергизованных митохондриях, так как она быстро расщепляется митохондриальными протеазами. После коллапса $\Delta\psi_m$ транслокация и деградация PINK1 блокируются, а PINK1 накапливается на внешней мембране митохондрий, образует ореол вокруг митохондрии и активирует цитозольную E3 убихитин лигазу Паркин. Последняя в течение часа транслоцируется из цитозоля в митохондрию во многих типах клеток, включая нейроны, скелетную мышцу, сердце и ткани печени, и подвергает убиквитинированию поврежденные митохондриальные белки, способствуя покрытию митохондрий изоляционными мембранами, которые затем сливаются с лизосомами. Дизрегуляция Паркин связана с болезнью Паркинсона и потерей нейронов субминимальной ниры (Kubli, Gustafsson, 2012; Suki et al., 2016; Youle, Narendra, 2011).

Как уже отмечалось, все три процесса – *слияние, деление и митофагия* – тесно взаимосвязаны и обозначаются в научной литературе термином «*митохондриальная динамика*», которая необходима для поддержания формы органелл, а также для нормального функционирования различных популяций митохондрий в клетке. Разбаланс этих процессов может инициировать апоптоз. Митохондриальная динамика позволяет митохондриям взаимодей-

ствовать друг с другом. Без нее в митохондриальной популяции появляются автономные органеллы с нарушенной функциональной активностью (Appaix et al., 2003; Chan D, 2012; Chen H., Chan, 2009; Chen Y. et al., 2011).

1.6.4 Подвижность и локализация митохондрий

Митохондрии способны к медленным флуктуирующим движениям по цитоплазме, что позволяет им, в конечном счете, перемещаться в клетке на сравнительно большие расстояния (Van Blik et al., 2013; Westerman et al., 2010; Zhao et al., 2013) и объединяться друг с другом, образуя сеть, состоящую из митохондриальных кластеров различного уровня организации. Таким образом, митохондрии могут существовать как единичные органеллы, либо образовывать митохондриальные кластеры разного размера, объединенные межмитохондриальными контактами (Бакеева, Ясайтис, 1972; Бакеева и др., 1977, 1982), либо формировать динамические сети с эндоплазматическим ретикуломом и внутриклеточным цитоскелетом (Anesti, Scorrano, 2006; Appaix et al., 2003; Kuznetsov, Margreiter, 2009; Kuznetsov et al., 1988, 2004 a, b, 2005, 2006, 2009; McBride et al., 2006). Их топология постоянно меняется, так как органеллы регулярно сливаются, делятся и подвергаются митофагии.

Разнообразие митохондриальных форм и внутриклеточных структур может быть связано с их узкоспециализированными клеточными функциями в клетках с различными потребностями в энергии и в типе митохондриальных субстратов, а также различиями в их физиологическом состоянии (степень энергизации, различия в окислительно-восстановительных состояниях, значениях мембранных потенциалов, уровне кальция).

Так например, в митохондриях поперечно-полосатых мышечных тканей межмитохондриальные контакты представляют собой особым образом организованную белковую мембранную структуру (митохондриальный ретикулум), который функционирует по принципу «электрических кабелей», обеспечивающих синхронное поступление АТФ ко всем саркомерам мышечного волокна (Skulachev, 2001, 2006; Bakeeva et al., 1978).

Система митохондриального ретикулама присутствует и в сердечной мышце (Бакеева и др., 1982; Bakeeva et al., 1985). Однако если в скелетной мышце преобладают сложно-разветвлённые гигантские формы митохондрий, имеющих большую протяжённость, то в кардиомиоцитах митохондриальный ретикулум представлен большим количеством крупных митохондрий, соединённых между собой как в поперечном, так и в продольном направлениях (по отношению к миофибриллам) с огромным количеством межмитохондриальных контактов, имеющих такое же строение, как и в митохондриях скелетной мышцы. По мнению авторов, они не являются результатом простого прилегания митохондрий, а являются особым образом организованной мембранной контактной структурой (Бакеева и др., 1985; Солодовникова, 2007; Bakeeva et al., 1985). При выделении изолированных митохондрий эти контакты могут исчезать. Имеются данные, что за межмитохондриальные контакты ответственен железо-серный белок CDGSH, который структурно связывает соседние митохондрии без их фактического слияния (Colca et al., 2004; Vernay et al., 2017).

В митохондриях печени были обнаружены особые межмембранные контакты – локальные зоны слияния или близкого прилегания наружной и внутренней митохондриальных мембран (Hackenbrock et al., 1968, 1975, 1986). На одну митохондрию диаметром 1 мкм может приходиться до 115 таких контактов.

Отдельные митохондриальные кластеры также способны к слиянию и делению (Bartolák-Suki et al., 2017). В первом случае формируются крупные образования числом от нескольких десятков до тысяч в зависимости от типа клетки. Эти кластеры образуют динамически взаимосвязанную митохондриальную ретикулярную сеть, которая может распространяться по всему объему клетки. Формирование этой сети включает слияние как внешних, так и внутренних мембран отдельных митохондриальных кластеров, а их содержание, включая ДНКмх, полностью смешивается в течение 12 часов (Legros et al., 2002; Suki et al., 2016). Удлиненные митохондриальные сети более эффективны при выработке энергии и способны распределять энергию на большие расстояния (Amchenkova et al., 1988; Skulachev, 2001). Замедление или остановка процесса способствуют образованию одной общей сети, а нарушение слияния – фрагментации митохондрий. Таким образом, соотношение этих процессов определяет структуру митохондриального ретикулума.

Большие митохондриальные кластеры могут делиться (Bartolák-Suki et al., 2017), в результате чего митохондриальный кластер расщепляется на два или более кластера. В нейронах деление контролируется длиной митохондриальных кластеров, тогда как слияние определяется их способностью к скольжению (Cagalinec et al., 2013). После деления меньшие кластеры могут стать почти сферическими, диаметром около нескольких сотен нанометров. Деление необходимо для удаления поврежденных митохондрий. Однако если этот процесс не контролируется и не сбалансирован со слиянием, сеть становится слишком фрагментированной.

Энергетическое состояние митохондрий критически связано с митохондриальной динамикой: снижение мембранного потенциала, ингибирование комплекса III и комплекса V (АТФ-синтазы), уменьшение содержания АТФ приводит к снижению скоростей деления и слияния митохондрий, замедлению подвижности и увеличению фрагментации кластеров (Giedt et al., 2012).

Такие белки, как GTPases, киназы и фосфатазы, участвуют в двунаправленной связи между митохондриальным ретикулумом и остальной частью клетки. Благодаря этим белкам устанавливается функционально-метаболическое и динамическое взаимодействие, обеспечивающее контроль за клеточным циклом, развитием, противовирусными реакциями и гибелью клеток (Зеркаленкова, 2015; Ferguson, De Camilli, 2012; Martinvalet 2018; Osellame et al., 2012).

Для нормального функционирования митохондрий большое значение имеет их внутриклеточное распределение. При нарушении нормального распределения митохондрий в клетках наблюдается прогрессирующее разрушение матрикса, а сами они собираются в группы и объединяются друг с другом около сарколеммы (Elgass et al., 2015; Otera et al., 2013).

Как уже говорилось, митохондрии локализуются около структур с высокими энергетическими запросами. В скелетных мышцах митохондрии находятся вблизи миофибрилл (Appaix et al., 2003); в нейронах – в синаптических окончаниях, в растущих аксонах, перехватах Ранвье (Chada, Hollenbeck, 2004;

Hollenbeck P.J., Saxton W.M., 2005); в сперматозоидах они образуют спиральный футляр вокруг оси жгутика; в секреторных клетках они тесно связаны с зонами упорядоченно расположенных мембран шероховатого эндоплазматического ретикулума. Расположение митохондриальной субпопуляции вблизи плазматической мембраны (субсарколеммальные митохондрии) необходимо для сопряжения синтеза энергии с работой АТФ-зависимой ионной помпы, ответственной за поступление Ca^{2+} в клетку. Такая субпопуляция может также защищать внутриклеточные структуры от высокой концентрации кислорода во внеклеточной среде и выполнять роль «защитного барьера». Митохондриальные кластеры, окружающие ядро, выполняют важную физиологическую роль драйверного механизма в импорте метаболитов из ядра в митохондрии, необходимых для генерации АТФ, а также в регуляции различных других ядерных функций (Dzeja et al., 2002; Kuznetsov, Margreiter, 2009; Park et al., 2001).

Существуют зоны тесного контакта между эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) и митохондриями (т.н. *митохондриальные связывающие ассоциативные мембраны* – МАМ), которые обеспечивают коммуникацию между ними и поддержание их специфической активности, в том числе биоэнергетических процессов и жизнеспособности клетки (рис. 7) (de Brito, Scorrano, 2010; Giorgi et al., 2009, 2015). ЭР – сложная замкнутая сеть, состоящая из трубкообразных полостей или мембранных трубочек, распространенная по всей клетке. Мембрана ЭР морфологически идентична ядерной мембране и составляет с ней единое целое. Эта структура играет важнейшую роль в целом ряде клеточных процессов, в том числе в образовании секреторных белков и жиров и внутриклеточном транспорте молекул.

Первоначально считалось, что МАМ необходимы для быстрого регулирования внутриклеточного уровня кальция путем передачи сигналов между ЭР и митохондриями (Leist et al., 1997). Действительно, эндоплазматическая (саркоплазматическая) сеть является основным кальциевым депо в поперечнополосатых мышечных тканях. Однако митохондрии также активно участвуют в процессе кальциевого гомеостаза, контролируя накопление и выброс ионов Ca^{2+} , причем скорость их транспорта зависит от мембранного потенциала органелл и концентрации этих ионов в цитозоле (Gunter et al., 2004; Seppet et al., 2001). Благодаря МАМ эти две органеллы не только совместно регулируют поток кальция, но и обмениваются липидами (Rieusset, 2011). Контакты МАМ являются динамическими структурами, которые чрезвычайно чувствительны к функционально-метаболическим изменениям в клетке. Это, видимо, обуславливает высокую вариабельность состава МАМ, в структуру которых, согласно протеомным исследованиям, входят более 1000 белков (Poston et al., 2013). Однако обязательными для МАМ являются ~ 70 белков (Raturi et al., 2013).

В зоне контакта две органеллы сближаются до расстояния 10–25 нм и удерживаются несколькими белковыми комплексами, включая и гетерокомплексы митофузинов (Rieusset, 2011; Rizzuto et al., 1998, 2009). Связи между митофузинами саркоплазматической сети и митофузинами наружной митохондриальной мембраны регулируют количество контактных точек. Таким образом, белки митохондриального слияния оказываются непосредственными участниками функционального кооперирования саркоплазматической и митохондриальной сетей.

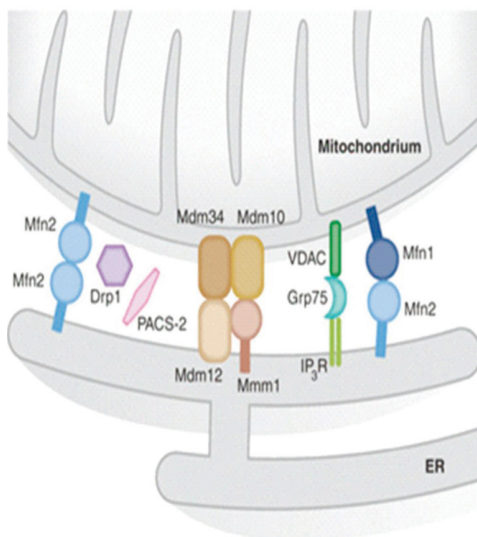


Рисунок 7 – Взаимодействие митохондрий и эндоплазматического ретикула (по de Brito, Scorrano, 2010)

Контакты митохондрий (Мх) с эндоплазматическим ретикулом – ER; взаимосвязь между ER и Мх через молекулярные мостики, регулирующие функциональный контакт: (*непрямая*) – PACS-2 and Drp1 – контролируют расстояние между ER и Мх, воздействуя на митохондриальную морфологию и распределение МХ в клетке; (*прямая*) – функциональная связь ER и МХ осуществляется через комплекс, состоящий из IP₃R (ER), цитозольного шаперона Grp75 и митохондриального анионного канала VDAC; Мультимерный комплекс ERMES, (Мх белки Mdm34 и Mdm10 и белки ER-Mmm1 and Mdm12) регулируют МХ-ER взаимодействие.

GTPase-зависимый белок ER - Mfn2 образует гомо-гетеродимеры с МХ Mfn1 or Mfn2, что обеспечивает высокосопреженный контакт между 2-мя органеллами

Доказано, что МАМ регулируют подвижность и форму митохондрий, продукцию ROS, АТФ, аутофагию, ЭР-стресс, иммунную сигнализацию, перенос липидов, образование аутофагосомы, деление митохондрий, гомеостаз Ca²⁺ и апоптоз. (Виноградская, 2014; Сухоруков, 2011; de Brito, Scorrano, 2010; Giorgi et al., 2015; Friedman et al, 2011; Labbé et al. 2014; Raturi, Simmen, 2013; Rieusset, 2011; Rowland, Voeltz, 2012; Westerman, 2010; Wikstrom et al., 2007).

Помимо эндоплазматического ретикула митохондрии могут образовывать контакты с плазматической мембраной клеток (PAM – *plasma membrane associated mitochondria*). При этом вследствие активации Ca²⁺ каналов плазматической мембраны концентрация ионов кальция в таких контактах может быть значительно выше, чем в контактах МАМ (Giacomello et al., 2010).

Распределение митохондрий в клетке регулируется также высокодинамичной системой цитоплазмы – *цитоскелетом*. Согласно современным представлениям, цитоскелет является механическим каркасом, локализованным в цитоплазме клетки, интегрирующим звеном, объединяющим разные части клетки и обеспечивающим передачу сигналов как внутри одной клетки, так и между разными клетками (Fletcher, Mullins, 2010; Giorgi, 2009; Bartolák-Suki et al., 2016; Mose-Larsen et al., 1982). В функции этой структуры входит поддержание и адаптация формы

клетки к внешним воздействиям, обеспечение ее движения, активный внутриклеточный транспорт и клеточное деление. Цитоскелет обеспечивает контакты митохондрий с мембраной, ядром и другими внутриклеточными органеллами и является «рельсами» для их транспорта внутри клетки (рис. 8). Он ускоряет направленное перемещение митохондрий в клетке, способствует преобразованию внешних механических стимулов во внутриклеточную сигнализацию, принимает участие в регуляции метаболической активности клетки. Имеются данные, что цитоскелетная сеть может реагировать на внешние механические воздействия, проявляя гистерезис и память, а долгоживущие цитоскелетные структуры могут быть эпигенетически унаследованы будущими поколениями после клеточного деления (Fletcher, Mullins, 2010; Bartolák-Suki et al., 2016).

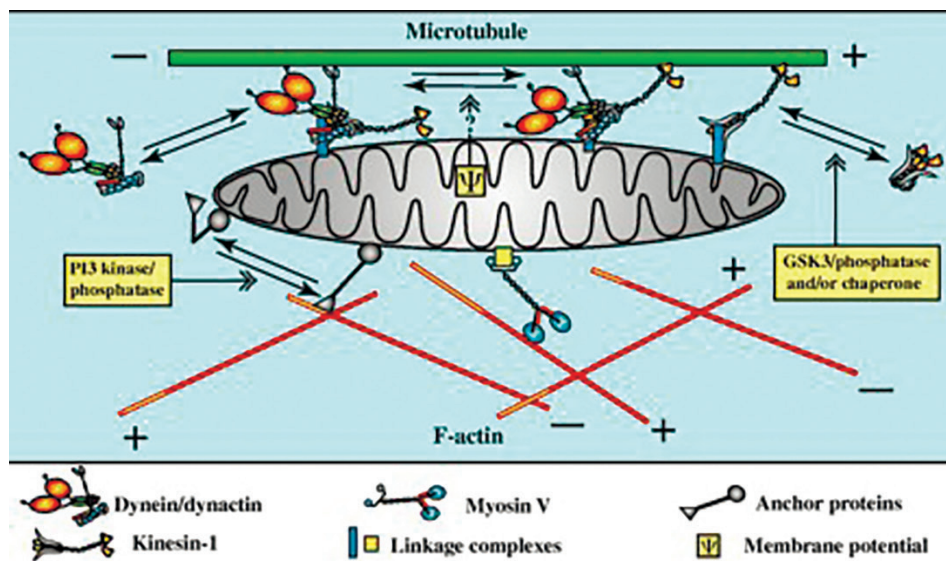


Рисунок 8 – Передвижение митохондрий (по Hollenbeck, Saxton, 2005)

Многие структуры цитоскелета могут легко разрушаться и вновь возникать, меняя свое расположение или морфологию. Они способны к самосборке. В основе этих особенностей лежат реакции деполимеризации основных структурных цитоскелетных белков и их взаимодействие с другими белками, как структурными, так и регуляторными (Giorgi et al., 2015; Kaasik 2001).

Цитоскелет представляет собой трехмерную сеть немембранных волокнистых и трубчатых структур различного генеза и состоит из трех основных типов полимеров – субъединиц особых глобулярных и фибриллярных белков: *актиновых филаментов (микрофиламентов), микротрубочек и промежуточных волокон*. Эти нити образуют взаимосвязанные сети с помощью сшивающих агентов, моторных белков и стабилизаторов. Количество и структурная организация этих сетей определяют форму и механику клетки. Эти сети могут реагировать на внешние воздействия путем реорганизации их сетевой структуры и передачи механических сигналов друг другу и различным органеллам. Белки этих сетей могут взаимодействовать с митохондриями, регулировать митохон-

дриальное дыхание и синтез АТФ и контролировать проницаемость внешней митохондриальной мембраны для АДФ (Heggeness et al., 1978; Kuznetsov et al., 2013; Sukhorukov et al., 2015). Все три цитоскелетные сети связаны с различными митохондриальными функциями.

Микрофиламенты (актиновые нити – 6-8 нм) состоят из плотно упакованной спирали из ориентированных глобулярных (G) актиновых мономеров (результат полимеризации глобулярного актина - G-актина.) (Kuznetsov, Schneeberger et al., 2004 a). Они играют ключевую роль в сократительном аппарате клеток, а также принимают участие в таких процессах, как подвижность, поддержание формы клеток, цитокинез. В клетке актиновые филаменты с помощью других белков могут образовывать множество разнообразных структур.

Микротрубочки (около 25 нм) построены из глобулярного белка тубулина, представляющего собой димеры α и β -субъединиц (53 и 55 кДа, *протофиламенты*) (Turrens, 2003). Эти протофиламенты образуют кольца (по 13 штук в каждом), которые полимеризуются в длинную микротрубочку, представляющую собой высоко динамичную полярную структуру, имеющую минус-конец, локализованный на centrosome вблизи ядра, и медленно растущий или быстро разбирающийся плюс-конец.

Центробежный транспорт митохондрий по микротрубочкам происходит с участием белков из семейства *кинезинов*. За перемещение митохондрий к ядру отвечает преимущественно цитоплазматический *динеин*. Существует модель «двойного транспорта», согласно которой за дальний транспорт органелл отвечают *кинезины* и *динеин*, ассоциированные с микротрубочками, а за локальные перемещения – *миозины*, ассоциированные с актиновыми филаментами (Langford, 2002).

Промежуточные волокна (филаменты) (около 10 нм) – это цитоплазматические фибриллярные белки, построенные наподобие каната, принадлежащие к пяти родственным семействам и проявляющие высокую степень клеточной специфичности: кератины, виментин, десмин, белки нейрофиламентов и белки ядерной ламина (Capetanaki, 2002; Hollenbeck, Saxton, 2005; Mendez et al., 2014; Suki et al., 2016). Все они имеют в центральной части базовую стержневую структуру, которая носит название суперспирализованной α -спирали.

Правильное распределение митохондрий достигается не только за счет транспорта по микротрубочкам и микрофиламентам, но и путем закрепления на различных цитоскелетных структурах (Hollenbeck, Saxton, 2005).

Часть митохондрий находятся в контакте с эндоплазматическим ретикуломом, в то время как другая – со структурами цитоскелета. Распределяясь во внутриклеточном пространстве большинства тканей соответственно цитоскелетной сетке и сливаясь, митохондрии формируют *внутриклеточную митохондриальную сеть*.

Таким образом, имеется сложнейшая функциональная система переноса энергии, в основе которой лежит компартментализация и взаимодействие митохондрий с другими органеллами, что и обеспечивает поддержание важнейшей функции клетки – синтеза энергии и клеточного гомеостаза в ответной реакции клетки на стрессовые раздражители.

1.6.5 Митохондриальная динамика и функция клетки

Исследования последних двух десятилетий подтвердили, что митохондриальная дыхательная цепь вовлечена в различные *внутриклеточные* сигнальные программы и выполняет роль сигнальной преобразовательной метаболической системы, активирующей функциональный ответ и реализацию физиологической реакции организма на самые различные воздействия, прежде всего, на гипоксию (Brunk, Terman, 2002; Butow, Avadhani, 2004; Chandel, Schumacker, 1999, 2000; Felty, Roy, 2005; Kusnetsov et al., 2004; McBride et al., 2006; McDonald, 2002; Michiels, 2004; Nichols, Samantha, 2000; Nishimura et al., 2001; Tait, Green, 2012; Zhu, Bunn, 1999).

Существует теснейшее взаимодействие *между митохондриальной динамикой и их энергосинтезирующей функцией*. Повышенная активность ОФ и увеличение производства АТФ стимулирует слияние митохондрий и их удлинение (Mitra et al., 2009; Tondera et al., 2009). Считается, что удлиненные митохондрии более эффективны при выработке энергии и способны распределять энергию на большие расстояния (Mitra et al., 2013; Skulachev, 2001; Tondera et al., 2009).

Продукция АТФ, регуляция кальциевого потока, клеточное старение и апоптоз, возможность развития окислительного стресса – все эти процессы зависят от слияния и деления митохондрий (Chan, 2012; Mironov, 2007; Mironov, Symonchuk, 2006; Parone et al., 2008; Picard et al., 2012; Soubannier, McBride, 2009). Процессы слияния и деления формируют важный механизм клеточной адаптации и во многом определяют судьбу клетки в экстремальной ситуации (Chan, 2006; Karbowski, Youle, 2003).

При усилении механизмов слияния митохондрий (Ong, Hausenloy, 2010; Sugioka et al., 2004) и при уменьшении их деления (Ong, Hausenloy, 2010) происходит снижение апоптотических сигналов. И наоборот, чем больше митохондрий делится, тем сильнее апоптотические сигналы.

Кроме того, если чрезмерно усилены процессы деления митохондрий, то в таких клетках происходит частичная потеря ДНКмх и возникают дыхательные дефекты (Suen et al., 2008).

Число митохондрий также отражает функциональное состояние клетки. *Увеличение* числа митохондрий наблюдается при гипертрофии, пролиферации и трансформации клеток, особенно после повреждения ткани. Оно, как правило, сопровождается усилением процесса ОФ. *Уменьшение* числа митохондрий наблюдается при старении клеток, их атрофии (Струков, Серов, 1995).

В зависимости от функционального состояния ткани в митохондриях меняется форма крист: встречаются трубчатые, пластинчатые и треугольные. Гигантские митохондрии образуются за счет слияния митохондрий и их гипертрофии и обнаруживаются, по-видимому, только при патологии. В этом случае могут встречаться митохондрии различной формы: извитые, каплеобразные, сигарообразные. Митохондриальная динамика участвует в регуляции сборки и разборки митохондриальных крист. Кажущаяся конденсация пространства матрикса, наблюдаемая с помощью электронной микроскопии, является отражением активного метаболического состояния митохондрий (McBride et al., 2006). При усилении активности митохондрий появляются пластинчатые кристы. Активные митохондрии имеют больше крист, обеспечивающих большую поверхность для распределения дыхательных комплексов. При понижении функциональной активности происходит деформация и агрегация крист. Фор-

ма и число крист также отражают пониженную или повышенную активность митохондрий. Увеличение числа крист митохондрий свидетельствует о возрастающих функциональных потребностях клетки (Струков, Серов, 1995).

С возрастом внутренняя митохондриальная мембрана утрачивает инвагинации, что связано с изменениями активности АТФ-синтазы. При этом уменьшается также количество пор в мембране митохондрий, она становится более гладкой. Все эти нарушения структурной организации митохондрий приводят к снижению эффективности работы дыхательной цепи и к нарушению обмена веществ (Daum et al., 2013)

Регуляторные белки имеют большое значение в жизнедеятельности клетки. Так удаление митофузинов и Opa1 в условиях *in vitro* и *in vivo* приводит к резкому снижению содержания ДНКмх, падению мембранного потенциала, подавлению функции дыхательной цепи, гибели нейронов мозжечка (клеток Пуркинье) (Chen H. et al., 2005, 2007, 2010).

Особое значение придается митохондриям как *источнику активных форм кислорода*, которые, согласно современным представлениям, выполняют роль главного внутриклеточного сигнального механизма в таких процессах, как регуляция активности ионных каналов и инициация цитозащитных механизмов при стрессах (Chandel, Schumacker, 2000; Gusy, Schumacker, 2006).

В 90-х годах прошлого столетия несколько групп исследователей пришли к выводу, что митохондрии взаимодействуют с цитозолем. Основанием для этого послужили наблюдения: 1) о высвобождении цит *c* из митохондрий, инициирующего гибель клеток (Toleikis, 1980; Toleikis et al., 2005); 2) о генерации митохондриями активных форм кислорода (ROS), индуцирующих экспрессию гипоксических генов (Chandel, Schumacker, 1999); 3) о локализации на наружной мембране митохондрий белков-фиксаторов А-киназы (АКАР), что позволяет сАМР-зависимой протеинкиназе (РКА) фосфорилировать субстраты на внешней мембране митохондрий (Chen Q., 1990); и (4) о дисфункции митохондрий, вызывающей индукцию белков теплового шока, специфичных для них и способствующих цитозольной кальциевой передаче сигналов (Biswas et al., 1999; Martinus et al., 1996).

Как уже указывалось выше, в эукариотических клетках тесное взаимодействие между ЭР и митохондриями структурно и функционально модулируется через специфические белки, образующиеся в определенных субдоменах мембраны ЭР – МАР. Это позволяет регулировать синтез липидов и быструю передачу сигналов кальция (Ca^{2+}) между эндоплазматическим ретикуломом и митохондриями, что имеет решающее значение для формирования внутриклеточной передачи сигналов Ca^{2+} , контроль за формой митохондрий, их подвижностью, энергетическим обменом, окислительно-восстановительным статусом (Van Bliek, 2014).

Митохондрии находятся в постоянной связи с цитозолем, что необходимо для координации баланса между энергетическими потребностями клетки и выработкой энергии путем ОФ (Duchen, 2004). Передача сигнала из митохондрий в цитозоль называется *ретроградной сигнализацией*, а из цитозоля к митохондриям – *сигнальной трансдукцией* (Chandel, 2014). Митохондрии содержат ряд ключевых, лимитирующих ферментов биосинтеза стероидов, синтеза гема, секреции желудочного сока.

Все эти исследования привели к формированию концепции, согласно которой митохондрии стали рассматриваться как *сигнальные органеллы*.

Глава II МИТОХОНДРИЯ И КИСЛОРОД (МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ)

2.1 Кислород, клетка, митохондрии

Роль кислорода в жизнедеятельности организма была установлена более 230 лет тому назад. В 1774 г. Шеел, Лавуазье и независимо от них Пристли пришли к заключению, что окружающий нас воздух состоит из смеси газов и содержит некий «дыхательный флюид» или «чистый воздух», или «огоньрождающий газ», который был назван Лавуазье *oxygene* (кислород – фр., так как при соединении с некоторыми веществами и водой он образует кислоты). Именно благодаря работам Лавуазье был нанесен сокрушительный удар по флогистонной теории и доказано, что дыхание – это медленное горение, которое продолжается до тех пор, пока не исчерпывается «чистый воздух» – кислород. Он же показал, что во время физической работы при увеличении затрат энергии организм потребляет больше кислорода, чем в покое, а температура тканей в это время повышается. Лавуазье и, независимо от него, Ломоносов М.В. близко подошли к современному пониманию сущности дыхания как окислительного процесса, который, согласно их представлению, происходит в крови. Несколько позже, во второй половине XVIII века Пфлюгер установил, что окислительные процессы происходят в тканях организма.

Однако только в XX веке сформировалось современное представление о *дыхании* как совокупности процессов, обеспечивающих поступление кислорода в организм с последующим его использованием в митохондриальной дыхательной цепи для окисления органических веществ с освобождением энергии и выделения углекислого газа в окружающую среду. Таким образом, дыхание способствует обеспечению организма энергией.

Все жизненные процессы связаны с расходом энергии, которая необходима для выполнения механической, осмотической, химической, электрической и тепловой работы. Поэтому обеспечение организма энергией – важнейшая его функция, осуществляемая в реакциях биологического окисления, занимающих центральное место в метаболизме клеток. Первичными продуктами, необходимыми для образования энергии, являются белки, углеводы и жиры, которые поступают в организм извне с пищей. Однако получению, накоплению и использованию энергии в организме предшествует сложный многоступенчатый путь превращения питательных веществ в формы, которые могут быть утилизированы в клетке в качестве источника энергии и пластического материала. Выделяются три основных стадии этого процесса (рис. 9).

Первая стадия реализуется в пищеварительном тракте. Поступающие в организм углеводы, жиры и белки предварительно расщепляются на более простые по структуре соединения и превращаются в сахара, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, глицерин и аминокислоты. При этом освобождается около 0,6-1% энергии, рассеивающейся в виде тепла. При сбалансированном поступлении в организм питательных веществ и их предварительной переработке появляется возможность их дальнейшего превращения в энергетическое топливо или пластические материалы.

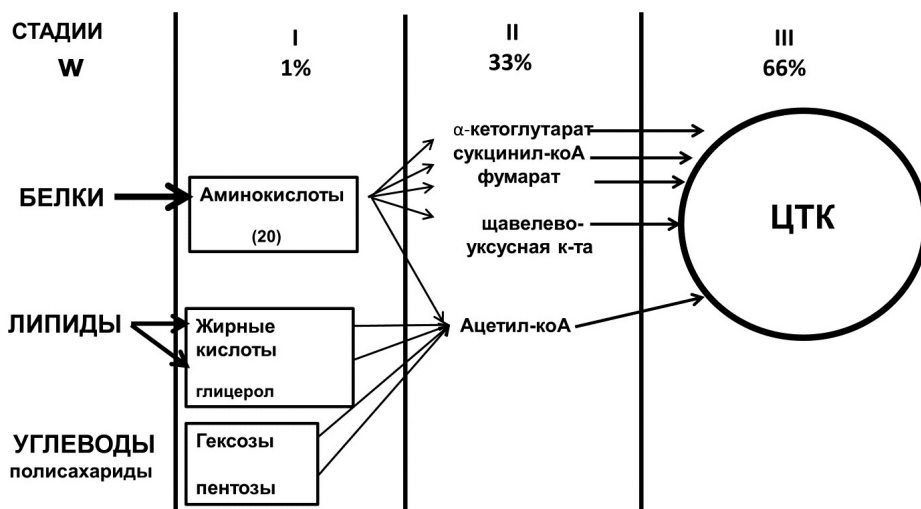


Рисунок 9 – Три стадии окисления питательных веществ

Вторая стадия связана с высвобождением около 10-30% энергии. Трансформация веществ, происходящая на втором этапе, обеспечивается работой ряда метаболических систем, таких как гликолиз, пентозофосфатный цикл, система азотистого обмена, система окисления жирных кислот. Число продуктов окисления, образующихся на втором этапе, постепенно уменьшается до ацетил-КоА, сукцинил-КоА, α-кетоглутаровой, щавелевоуксусной и фумаровой кислот, участвующих далее в окислительных процессах цикла Кребса (цикла трикарбоновых кислот – ЦТК) и распадающихся до CO_2 с высвобождением водорода, который акцептируется пиридиннуклеотидами (ПНН) или флавопротеидами (ФП).

Третья стадия является заключительной стадией окисления питательных веществ, во время которой выделяется до 60-70% всей освобождаемой энергии исходных продуктов. Дыхание способствует освобождению этой энергии. Этот процесс реализуется в митохондриях через ЦТК и митохондриальную дыхательную цепь, по которой ПНН и ФП передают свои электроны на молекулярный кислород и восстанавливают его до воды. При этом происходит сопряженный синтез универсальной формы энергии в виде АТФ. В конечном счете все основные исходные питательные вещества в результате катаболических реакций превращаются в CO_2 и H_2O . Поддержание жизнедеятельности требует постоянного поступления АТФ, без которого она невозможна.

Таким образом, биологический сигнал, детектирующий недостаточность O_2 , работает на трех уровнях: системном, клеточном и субклеточно-молекулярном. На системном уровне изменения в содержании кислорода детектируются центральными и периферическими хеморецепторами. На клеточном уровне чувствительность к дефициту кислорода связана с активностью ферментов митохондриальной дыхательной цепи.

Кислородный гомеостаз – это важный механизм в жизнедеятельности эукариот, который контролирует кислородное обеспечение тканей в организме и реализуется за счет компенсаторных и адаптивных реакций, осуществляемых на органном и клеточно-молекулярном уровнях. Сущность его заключается в создании и поддержании эволюционно закрепленного оптимального уровня напряжения кислорода в структурах, ответственных за освобождение энергии и ее утилизацию; в обеспечении условий функционирования окислительных ферментов; в поддержании на заданном уровне всех без исключения показателей жизнедеятельности: ионной асимметрии, возбудимости мембран, синтеза белков, сокращения контрактильных элементов, секреции и пр.; наконец, в обеспечении доставки кислорода в цепь терминального окисления.

Таким образом, *кислородный гомеостаз* – это один из важнейших элементов энергетического обмена. Его нарушения, приводящие к ограничению доставки кислорода к клеткам, способствуют формированию различных патологических состояний, которые известны под общим названием *гипоксия*.

Парциальное давление кислорода в атмосфере равно 159 мм рт. ст., а минимальное парциальное давление кислорода в клетке, определяющее граничные условия ее функционирования, лежат в пределах 1-10 мм рт. ст. Наличие такого большого градиента требует создания специальных транспортных систем кислорода из окружающей среды в клетку. Животные, имеющие систему кровообращения, обладают особой многоступенчатой системой транспорта кислорода практически ко всем клеткам организма. У позвоночных и человека этот процесс разделяется на три основных этапа. *Первый* из них связан с регулированием кислородного гомеостаза на организменном уровне и его транспортом к органам и клеткам (внешнее дыхание, транспорт газов с кровью); *второй* – с переносом кислорода через межклеточное пространство и клеточную мембрану; *третий* касается использования кислорода в метаболических путях в самой клетке (тканевое дыхание, связанное с функцией дыхательной цепи).

Два первых этапа находятся под контролем центральной и нейрогуморальной систем и каждое звено имеет свои компенсаторные механизмы, обеспечивающие поддержание и сохранение кислородного гомеостаза в широких пределах изменений внешних условий. Третий этап протекает в клетке. Каждый этап обладает своими компенсаторными возможностями.

На *первом* этапе с помощью *внешнего звена системы дыхания* обеспечивается вентиляция легких, т.е. газообмен между альвеолами и окружающей средой и между кровью организма и газовой смесью, находящейся в легких. При этом кислород поступает вместе с воздухом из окружающей среды по «воздухоносному пути» в дыхательные пути. Это *активный* (принудительный, энергозависимый) процесс, который обеспечивается сокращением дыхательных мышц, сжатием и расширением легких и включает легочную вазоконстрикцию, обеспечивающую поддержание обмена газов в легких, и хемотрансдукцию каротидных клубочков, способствующую стимуляции легочной вентиляции, а также адаптивные реакции, связанные с системой масса-переноса крови, эритроцитами, гемоглобином.

Следующие этапы дыхания осуществляются посредством *внутреннего звена системы дыхания*, включающего кровь, сердечно-сосудистую систе-

му и специализированные органеллы клетки – митохондрии, ответственные за *внутриклеточное (тканевое) дыхание*. Вначале кислород через ткань, выстилающую внутреннюю поверхность легких, диффундирует в носитель (у высших животных – это кровь) и депонируется в эритроцитах, обратимо связываясь с белком – гемоглобином, имеющим четыре центра связывания.

Образование и диссоциация комплекса кислорода с гемоглобином играет исключительно важную роль в кислородном обеспечении тканей и одновременно является наиболее изученным регуляторным механизмом дыхания. В силу очень низкого коэффициента растворимости лишь очень небольшая часть молекулярного кислорода (0,3 об% O_2) находится в крови в растворенном виде. Практически весь O_2 (около 20 об%) переносится кровью в виде химического соединения с гемоглобином. Процессы связывания кислорода с гемоглобином, его транспорт кровью и движение O_2 в межклеточной жидкости также являются *активными*.

В отличие от этого обмен газов между кровью капилляров и тканями носит преимущественно *пассивный* характер. В его основе лежит *диффузия*. Со времен Крога считается, что она является важнейшим механизмом транспорта газов в тканях.

На пути, который кислород преодолевает до того, как попадает в клетку, имеется несколько участков, где диффузионные процессы играют ведущую роль. Это происходит там, где молекулы кислорода проникают через мембранные образования: альвеолярную мембрану капилляров, оболочку эритроцита, клеточную мембрану. Нарушение нормального режима функционирования практически на любом участке пути, по которому транспортируется кислород, может привести к недостаточному обеспечению им ткани и в конечном итоге – к потере функции клетки. В условиях нормальной жизнедеятельности организма интенсивность внешнего дыхания и возможности транспортной функции крови должны быть строго сбалансированы с суммарной скоростью потребления кислорода. Механизмы, регулирующие первые два этапа кислородного гомеостаза, несомненно должны быть связаны с регуляцией потребления кислорода в отдельных клетках. В связи с этим изучение транспорта кислорода на последнем участке его пути к клетке – при его переходе из капилляров в ткань и при проникновении в глубь ткани и в клетки – приобретает особую значимость.

Согласно современным представлениям, молекулярный кислород, освобождающийся при диссоциации гемоглобина в капиллярах, благодаря диффузии проходит через капиллярную стенку, межклеточную среду и поступает в клетки тканей. Этому способствует малый размер и электронейтральность его молекулы. На сегодняшний день нет никаких доказательств, что перенос кислорода через гистогематические барьеры или плазматическую мембрану происходит с затратами энергии. Энергетические расходы на транспорт кислорода определяются только работой мускулатуры и передвижением крови по сосудам. Благоприятные условия для диффузии кислорода в организме животных создаются за счет концентрационных градиентов pO_2 , обозначаемых на системном уровне как «*каскады*» *напряжения*.

Долгое время считалось, что скорость диффузии кислорода в клетку определяется разностью его концентраций между внутри- и внеклеточной

средой. Согласно таким представлениям, концентрация кислорода во внеклеточном пространстве должна зависеть от уровня оксигенации и удаленности клетки от капилляра, а внутриклеточная концентрация кислорода – определяться соотношением между скоростью его поступления в клетку и скоростью его утилизации. Увеличение скорости поглощения кислорода клеткой должно приводить к уменьшению его внутриклеточной концентрации и парциального давления, что влечет за собой увеличение градиента pO_2 через клеточную мембрану и скорости диффузии. Таким образом, *увеличение активности кислород-потребляющих метаболических путей клетки должно стимулировать поступление в нее кислорода.*

Однако хорошо известно, что применительно к живым объектам можно говорить скорее не о пассивной, а об *облегченной диффузии кислорода*, которая включает *неэнергезависимый перенос кислорода путем его связывания с носителем*. Классическим примером такого рода является образование *оксигемоглобина* в эритроцитах. Другой пример – *облегченная диффузия кислорода* в мышечной ткани, осуществляемая *миоглобином* – белком, во многом сходном с гемоглобином, но имеющим лишь один центр связывания с кислородом. В обычных условиях миоглобин образует лабильный комплекс с кислородом. Последний высвобождается при снижении pO_2 в клетке. Это имеет место, например, при активной физической нагрузке, когда скорость дыхания в мышцах резко возрастает. Значительная часть кислорода переносится на цитохромоксидазу миоглобином. Таким образом, в этом случае происходит объединение двух процессов: *облегченной диффузии* и *депонирования кислорода*, что позволяет стабилизировать pO_2 в клетке подобно тому, как это происходит в эритроците. То же самое имеет место при сниженных значениях pO_2 . В области 0-5 мм рт. ст. миоглобин поставляет клетке до 40% кислорода.

При низкой метаболической активности клетки (и поэтому малой скорости потребления кислорода дыхательной цепью) избыточная часть кислорода может запасаться *каротиноидами* посредством использования ненасыщенных двойных связей. Предполагается, что перенос кислорода от каротиноидов к цитохромоксидазе осуществляется с помощью миоглобина. *Липофусциновые гранулы* в нейронах теплокровных животных, содержащие в своем составе каротиноиды, миоглобин и некоторые окислительные ферменты (флавопротеиды, гемопротеиды), также, видимо, выполняют двойную функцию: *внутриклеточного депонирования кислорода* и его переноса на цитохромоксидазу в условиях сниженного pO_2 .

Принципиальной особенностью живой системы является то, что транспорт кислорода в клетку на всех его этапах – *регулируемый* процесс. Каждый диффузионный участок в транспорте кислорода тесно сопряжен с регуляцией на системном уровне, которая включает комплекс реакций, обеспечивающих адекватную доставку кислорода. Иными словами, транспорт кислорода находится под контролем и регулируется изменением скорости кровотока, сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, увеличением концентрации гемоглобина в крови, увеличением плотности капиллярной сети и пр. (Лукиянова, Балмуханов, Уголев, 1982). Все эти механизмы системной регуляции позволяют поддерживать около клетки необходимую ей величину

ну pO_2 . В целом создаются точно отрегулированные и сбалансированные условия, обеспечивающие увеличение эффективности транспорта кислорода в клетку сравнительно с пассивной диффузией, которая определяется прежде всего потребностями кислород-зависимых метаболических систем.

2.2 Градиент O_2 на участке плазматическая мембрана – митохондрия

Последний, наиболее количественно значимый «каскад» напряжения кислорода находится на участке «внеклеточная жидкость – митохондрии». В основе формирования этого концентрационного градиента pO_2 лежат три главных фактора: 1) коэффициент диффузии (Кдифф) кислорода; 2) скорость поглощения кислорода и 3) геометрия кислород-зависимых внутриклеточных структур и прежде всего распределение митохондрий в клетке.

Согласно современным представлениям, Кдифф прямо зависит прежде всего от пути, который должен пройти кислород. В клетках его значения составляют 10^{-6} см²/сек. В изолированных митохондриях он на порядок ниже (10^{-7} см²/сек). К факторам, влияющим на Кдифф и уменьшающим его, могут быть отнесены высокая вязкость цитоплазмы, фибриллярная структура цитозоля, которая является причиной анизотропной диффузии кислорода, относительно небольшой объем доступной для диффузии воды, который составляет только около 60% от общего объема клетки, что связано с частичной гидратацией молекул в клетке (Дудченко, 2003; Лукьянова, Балмуханов, Уголев, 1982). Гидратация тела клетки способствует дополнительному переносу кислорода и увеличению его концентрации в цитозоле тела нейрона. Разжижение цитоплазмы и увеличение золь относительно геля приводит к снижению внутриклеточной концентрации кальция в цитозоле и увеличению градиента pO_2 между наружной и внутренней средой клетки (Загускин, 2006; Загускина, 1978; Загускин, Загускина, 1977, 2006).

Расчеты концентрационного градиента pO_2 в различных типах клеток (гепатоцитах, кардиомиоцитах, клетках нейробластомы, а также в изолированном перфузируемом сердце) показало, что его увеличение происходит при снижении Кдифф (Kennedy, Jones, 1986; Oshino et al., 1975).

Более того, оказалось, что концентрационный градиент pO_2 зависит от скорости дыхания тканевых препаратов: в разных клетках при низких скоростях он составлял 1,8-3 мкМ O_2 ; при активации дыхания в 6-8 раз градиент pO_2 возрастал в 7-10 раз (см. Дудченко, 2003). Таким образом, и скорость дыхания, и Кдифф оказывают существенное влияние на величину концентрационного градиента O_2 в клетке.

Существует **обратная** зависимость между величиной Кдифф для O_2 и градиентом pO_2 на участке мембрана – внутриклеточный компартмент, и **прямая** – между скоростью дыхания и градиентом pO_2 .

Однако при расчетах величин O_2 -градиента разные авторы, используя примерно одинаковые значения Кдифф, получали результаты, различающиеся почти на порядок. Более того, непонятным и дискуссионным оставался факт существования внутриклеточных участков с различными значениями

pO_2 , вплоть до нулевых. Предполагалось, что это – функциональные участки органелл, обладающие высокой скоростью потребления кислорода, благодаря чему и поддерживалось существование внутриклеточного кислородного концентрационного градиента.

Специальная проверка этого вопроса показала, что ни неперемешиваемый слой среды инкубации вокруг каждой клетки, ни наружная митохондриальная мембрана, ни путь до эндоплазматического ретикулума и пероксисом не представляют сколько-нибудь значительного барьера для диффузии кислорода. В то же время в перфузируемой печени высокий градиент кислорода поддерживался между внеклеточной средой и митохондриями, в то время как между перфузатом и гликолатоксидазой (пероксисомы) он был низким (Дудченко, 2003; Oshino et al., 1975).

Аналогичные результаты были получены на перфузируемом сердце: на этой модели было показано существование большого градиента O_2 между миоглобином и митохондриями, в то время как между миоглобином и перфузатом он был незначителен (Tamura et al., 1975).

При измерении поверхностной флуоресценции НАДН в перфузируемом сердце также были получены данные о наличии концентрационного градиента O_2 на участке внеклеточная среда – митохондрии. Кроме того было показано наличие гетерогенной флуоресценции в клетке. Так при инкубации гепатоцитов в среде, содержащей 6 мкМ O_2 , уровень кислорода в цитозоле колебался в пределах 2-5 мкМ, а в области митохондрий он был менее 2 мкМ. Эти эффекты не были связаны с неравномерной перфузией, но могли быть результатом величины и распределения внутриклеточного градиента кислорода (Jones, Mason, 1978; Jones, Kennedy, 1986; Jones et al., 1990).

Все это в совокупности предполагает, что внутриклеточный градиент кислорода формируется в области митохондрий, а не в других компартментах (рис. 10).

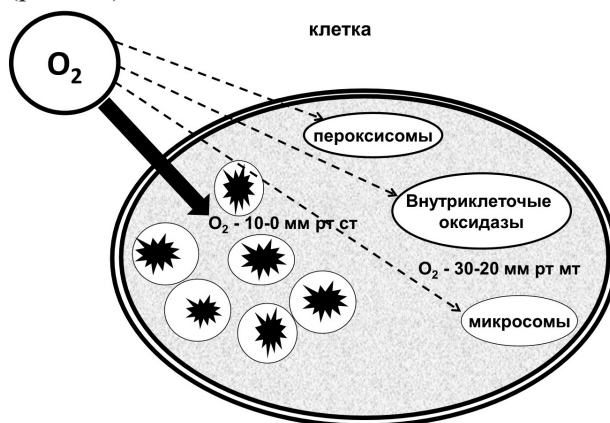


Рисунок 10 – Направленность кислородного градиента «вне клетки – клетка» и образование внутриклеточных зон со сниженным pO_2 определяются митохондриями, их внутриклеточной кластеризацией

Гетерогенное распределение внутриклеточного градиента O_2 может быть связано с кластеризацией митохондрий внутри клетки. Это предположение

было подтверждено совокупностью электронно-микроскопических и математических исследований, в которых было показано, что действительно внутри клетки существует кластеризация митохондрий с эффективным радиусом около 2 мкм. При этом кислород-зависимые ферменты цитоплазмы, эндоплазматического ретикулума, пероксисом и других частей клетки находятся в среде с концентрацией кислорода, близкой к его концентрации в среде инкубации, а митохондрии внутри кластеров функционируют при более низких концентрациях O_2 (Kaasik et al., 2001).

Перераспределение митохондрий внутри клетки может способствовать усилению диффузии в клетку кислорода и соответствует фактам подвижности митохондрий в моменты изменения функционального и метаболического состояния (Bereiter, Mokawe, 1973). Сочетание только двух переменных факторов: кластеризации и скорости дыхания митохондрий, – может привести к увеличению градиента O_2 в клетке на два порядка. Митохондрии поглощают при этом входящие ионы кальция, задерживая увеличение его концентрации и развитие гипоксии (Костюк и др., 2004).

Важнейшее значение в сложных регуляторных взаимоотношениях между доставкой кислорода в клетку и формированием концентрационного градиента кислорода имеет функциональная и метаболическая активность клетки. Показано, например, что быстрые растяжения мышцы, сопровождающиеся раздражением механорецептора и увеличением частоты нервных импульсов, вызывает увеличение числа митохондрий с высокой активностью цитохромоксидазы (ЦХО) вблизи плазматической мембраны дендритов и тела нервной клетки (Загускин, 2006). При этом увеличивалась степень кластеризации митохондрий, потенцирующая увеличение градиента pO_2 до размеров, существенно превосходящих величины, характерные для покоящихся клеток с равномерно распределенными в цитозоле митохондриями. Более того, активация ансамбля нейронов приводит к согласованию ритмов функциональной активности и ритмов синхронизации дыхательной активности митохондрий в этих клетках с ритмами микроциркуляции крови в артериолах, кровенаполнением соответствующего участка ткани и открытием капилляров вблизи активных клеток. Доказательства такой синхронизации ритмов агрегации митохондрий и колебаний pO_2 над поверхностью тела нейрона также были получены (Загускин и Загускина, 1977, 1978, 1996, 2006). Этими авторами впервые были описаны сходные по длительности периодов (около 3 минут) ритмы колебаний pO_2 над поверхностью тела нейрона при его функциональной активности, коррелирующие с агрегацией митохондрий. В состоянии покоя достоверных колебаний pO_2 над поверхностью тела нейрона не наблюдалось. Однако в первые 2 минуты после возбуждения или торможения нейрона появлялись колебания pO_2 с амплитудой до 20% от исходного уровня.

В этот же период происходило *уменьшение* степени агрегации митохондрий и максимальное *увеличение* в них активности ЦХО. При завершении переходного процесса после возбуждения или торможения нейрона происходило *увеличение* агрегации митохондрий и относительное снижение активности ЦХО, что трактуется как эффективная саморегуляция энергетического обмена в нейроне по уровню функционирования и минимизация энергозатрат. *Дезагрегация* митохондрий *увеличивает* их суммарную свободную поверхность,

способствуя транспорту субстратов энергетического обмена и диффузии кислорода, а *агрегация* митохондрий *снижает* их энергетический обмен.

Таким образом, изменение среднего уровня агрегации митохондрий в теле нейрона можно рассматривать как фактор регуляции потребления кислорода и скорости его диффузии в клетку.

Увеличение активности ЦХО в нейронах мозга при ишемии и гипоксии можно рассматривать как одну из стадий защитного компенсаторного механизма в этих условиях (Smialek, Hamberger, 1970). Кроме того, гидратация тела клетки способствует дополнительному переносу кислорода и увеличению его концентрации в цитозоле тела нейрона.

Эти и другие аналогичные данные свидетельствуют о том, что концентрационный градиент кислорода в организме формируется в клетке. При этом «насосной станцией», определяющей поступление кислорода из окружающей среды, являются митохондрии, так как именно они представляют собой конечное звено взаимодействия с молекулярным кислородом (Дудченко, 2003; Лукьянова, 2008; Brunk, Terman, 2002; Lukyanova et al., 2010).

2.3 Дыхание как показатель состояния энергетического обмена

Вдыхаемый нами воздух в конечном счете отражает состояние и запросы митохондрий в кислороде, так как именно они являются главными его потребителями: до 98 % кислорода, поступающего в организм, связано с митохондриальным дыханием. В результате этого процесса в клетках различных тканей млекопитающих генерируется до 80–90 % АТФ.

Потребление кислорода митохондриями является одним из важнейших показателей, характеризующих интенсивность аэробного энергетического обмена. Регуляция дыхания в аэробных клетках, связанная с производством АТФ, предполагает наличие соответствующих механизмов контроля скорости окислительно-восстановительных превращений в митохондриях. Знание этих механизмов и параметров, включающихся в регуляторный процесс, необходимо для контроля за сохранением энергетического обмена.

Поддержание активности дыхательной цепи, сопряженной с синтезом АТФ, предполагает наличие сложной системы его регуляции, благодаря которой в нормальных физиологических условиях устанавливается динамическое равновесие между продуктом реакции и ее субстратом – скоростью образования промежуточных метаболитов цикла Кребса, АТФ и скоростью потребления кислорода. ОФ протекает только при участии акцептора фосфата – АДФ, который может запускать цепь окислительно-восстановительных превращений в дыхательной цепи, сопровождаемых усилением потребления кислорода.

В работах Чанса и Уильямса (Chance, Williams, 1955a, b, 1965) было обращено внимание на гиперболическую зависимость между скоростью дыхания и внемитохондриальной концентрацией АДФ. Эти работы позволили Чансу постулировать, что кинетические параметры дыхания изолированных митохондрий определяются и регулируются тремя основными факторами: наличием 1) субстратов окисления, 2) акцептора фосфата – АДФ и 3) кислорода. Взаимодействие всех этих составляющих приводит к появлению нескольких

возможных стационарных состояний, описываемых характерными изменениями скоростей потребления кислорода митохондриями и спектрофотометрически по соотношению окисленно-восстановленных форм дыхательных переносчиков. На основании этого Чансом были сформулированы хорошо известные представления о пяти метаболических состояниях изолированных митохондрий, в каждом из которых поток электронов через дыхательную цепь лимитируется различными кинетическими причинами.

Состояние 1 – митохондрии лишены экзогенных субстратов окисления и акцептора фосфата; дыхание и фосфорилирование отсутствуют; дыхательные переносчики максимально окислены.

Состояние 2 – в системе имеются субстраты окисления, но нет акцептора фосфата; скорость дыхания мала, фосфорилирование отсутствует; дыхательные переносчики в значительной степени восстановлены.

Состояние 3 – «активное». Митохондрии обеспечены и субстратами окисления, акцептором фосфата (АДФ), и кислородом. При этом происходит резкая стимуляция дыхания, которая в этих условиях сопровождается фосфорилированием с образованием АТФ, увеличением в матриксе концентрации окисленных форм дыхательных переносчиков и преобладанием НАД⁺ над его восстановленной формой. Такое состояние характерно для активно функционирующих клеток.

Состояние 4 – «контролируемое» или «отрегулированное» (состояние «покоя»). В системе продолжает оставаться высокой концентрация субстратов окисления, хотя происходит истощение акцептора фосфата (АДФ) и процесс фосфорилирования становится невозможным. Запасы АТФ в клетке максимальны. В силу всего этого скорость поглощения кислорода резко падает по сравнению с состоянием 3; степень восстановленности переносчиков, в том числе НАДН, снова возрастает и митохондрии переходят на наиболее экономный режим работы. Коэффициент их полезного действия как энергообразующей системы в этом случае приближается к 100 %. Предполагается, что скорость дыхания в этом состоянии регулируется отношением концентраций АТФ к АДФ и Фн и находится под термодинамическим контролем.

Увеличение энергетического запроса в клетке ведет к переходу митохондрий из 4-го в 3-е состояние. При этом термодинамический контроль сменяется на кинетический.

Состояние 5 – митохондрии находятся в условиях избытка субстратов окисления и акцептора фосфата, но в среде инкубации отсутствует кислород (модель гипоксии); перенос электронов в дыхательной цепи не происходит так же, как и процесс фосфорилирования; степень восстановленности переносчиков максимальна. Состояние 5 реализуется также в случае блокирования цитохромоксидазы, когда содержание кислорода достаточно высоко, но перенос на него электронов по дыхательной цепи отсутствует.

Таким образом, согласно Чансу, изолированные митохондрии способны поддерживать устойчивые режимы активности – «метаболические состояния», свидетельствующие о сохранении регуляторных биоэнергетических механизмов на этом уровне и отличающие их от большинства химических систем. Метаболические состояния митохондрий – это очень тонкий регуляторный механизм, чувствительный к изменению различных параметров аденилатного пула (АТФ,

АДФ, АМФ), а также Фн, и используемый клеткой для реализации различных энергетических запросов, связанных с ее функциональной активностью.

Согласно схеме Чанса, область «кинетического» (динамического) контроля (активация дыхания в присутствии экзогенной АДФ в стационарном состоянии **3**) позволяет получать кинетические характеристики процесса ОФ: его скорость ($\text{АДФ}/t$, где t – время фосфорилирования), а также стехиометрию процесса и его эффективность ($\text{АДФ}/\text{О}$). Относительным показателем интенсивности ОФ и одновременно степени сопряженности является индекс дыхательного контроля или дыхательный контроль (ДК). Он выражается в виде отношения скоростей дыхания в состоянии **3** и **4** и характеризует различия в потреблении кислорода во время активного фосфорилирования и после его завершения. При переходе от **3**-го к **4**-му состояниям оптическими методами регистрируются окислительно-восстановительные изменения основных компонентов дыхательной цепи.

Особенности образования энергии, связанные с работой дыхательной цепи, установленные на изолированных субклеточных органеллах – митохондриях, либо их фрагментах – субмитохондриальных частицах, сохраняются в интактных клетках.

Рассмотрение этих концепций регуляции энергетического обмена имеет принципиальное значение для понимания возможности их нарушения при разных патологиях, и в первую очередь – при гипоксии.

Однако оценку дыхательного контроля в интактной клетке, в митохондриях которой сохраняется общая закономерность расположения дыхательных переносчиков сравнительно с изолированными органеллами, видимо, нельзя рассматривать в отрыве от ее функциональной активности, так как именно усиление последней является главной причиной, стимулирующей образование энергии и определяющей ее поступление на нужды эндергонических реакций.

По аналогии с изолированными митохондриями можно говорить о том, что покоящаяся ткань более всего приближается к метаболическому состоянию **4**.

Усиление в клетке процессов, потребляющих АТФ, должно приводить к образованию эндогенной АДФ, активации в связи с этим транспорта электронов в дыхательной цепи и сопряженного увеличения потребления кислорода, т.е. переходу митохондрий из состояния **4** в состояние **3**. В этом случае термодинамический контроль за работой дыхательной цепи сменяется на кинетический контроль. Однако синтез и расход энергии в клетках протекают практически одновременно, и образующаяся АТФ может сразу же утилизироваться в АТФ-зависимых реакциях. В зависимости от специфики функциональной деятельности клетки условия проявления дыхательного контроля в различных тканевых препаратах могут быть не одинаковыми (Chance, 1965; Chance, Hollunger, 1961).

Более того, дыхательная цепь в условиях *in vivo* может иметь иную степень восстановленности дыхательных переносчиков сравнительно с изолированными митохондриями. Так показано, что цитохромный участок дыхательной цепи *in vivo* находится в более восстановленном, а НАДН-зависимый – в более окисленном состоянии, чем *in vitro*. Наибольшие различия с изолированными митохондриями обнаруживает цитохромоксидаза (ЦХО). В мозге, например, при вдыхании животными воздуха цитохром *a, a₃* восстановлен на 70-85% (против 1-4% в суспензии митохондрий), поэтому

аноксия может изменить его не более чем на 15%. Эта и сходно высокая степень восстановленности не связана с внутриклеточной гипоксией, так как *in vivo* ткань мозга в достаточной степени обеспечена кислородом. Максимальное окисление цитохромоксидазы имеет место лишь при вдыхании животными смеси, состоящей из 5% CO₂ и 95% O₂. В этих условиях наблюдается лимит по субстратам и митохондрии в клетке находятся в состоянии, близком к состоянию 2 по Чансу («истощенные митохондрии»).

Работы Чанса сыграли огромную роль в биоэнергетике, составив на определенном историческом этапе ее методическую основу. Кинетический контроль дыхания широко используется до настоящего времени в качестве методического подхода для оценки степени энергизации препарата в условиях *in vitro*. Считается, что более высокие значения дыхательного контроля свидетельствуют о лучшей сопряженности процессов окислительного фосфорилирования. Этот подход используется не только для решения теоретических, но и практических задач биоэнергетики. Благодаря ему на модельных системах в условиях *in vitro* можно получать сравнительные данные о влиянии различных функциональных состояний, в том числе и патологий, на энергетический обмен.

В свое время методология, предложенная Чансом для оценки энергетического статуса, получила чрезвычайно широкое распространение и использование как в фундаментальных, так и прикладных экспериментальных исследованиях.

2.4 «Градации метаболических состояний» и биохимический цикл возбуждения

Развитием этого направления явились исследования М.Н. Кондрашовой, в которых «кинетический контроль» дыхания и другие параметры ОФ изолированных митохондрий использовались для оценки свойств и реактивности тканей в разных функциональных состояниях. Оказалось, что любые внешние воздействия на организм, меняющие его функциональное состояние, тем самым влияют на поведение митохондрий и на состояние дыхательной цепи последних и их метаболические характеристики, которые могут быть выявлены в условиях эксперимента. Они выражаются в очень небольших количественных изменениях различных параметров ОФ, отличающихся от принятой классификации Чанса, отражающих появление свободно-сопряженных состояний. В связи с этим появилось понятие «градации метаболических состояний» (Кондрашова, 1968-2002; Маевский и др., 1989, 1996), которые в совокупности позволяют очень тонко дифференцировать степень энергизации препарата, коррелирующую с функциональным состоянием клетки. Это удачная попытка применения различных параметров дыхания и ОФ для классификации переменного-сопряженных состояний изолированных митохондрий. Проявление «градаций метаболических состояний» в изолированных митохондриях указывает на сохранение у них механизмов, ответственных за обеспечение стационарного режима физиологической деятельности, характерных для неповрежденных органов.

Изменения метаболических состояний митохондрий при усиливающих-ся воздействиях на организм представляются в виде циклического процесса,

развивающегося в 4 фазы. Исходному метаболическому состоянию соответствует отрегулированное метаболическое состояние. Начальное действие раздражителей, создающих умеренный энергетический дефицит в ткани, приводит, вследствие возникающей при этом активации энергетического обмена, к установлению более высокого уровня внутримитохондриальных богатых энергией соединений. Первичным ответом в связи с этим может быть кажущееся «усиление» сопряжения митохондрий, выражающееся в снижении эндогенного дыхания, уменьшении скорости стимулированного АДФ дыхания по сравнению с предыдущим состоянием, укорочении времени фосфорилирования и снижении скорости дыхания после фосфорилирования. Этот эффект объясняется тем, что умеренный дефицит богатых энергией соединений несколько ослабляет торможение переноса электронов цепью накопления энергии и фосфорилирования («мягкое разобщение»).

Дальнейшее увеличение воздействия приводит к переходу этого эффекта в противоположный, разобщающий, который выражается в характерном повышении дыхания без акцептора фосфата, ослаблении стимулирующего действия АДФ (уменьшение или отсутствие дыхательного контроля или переход от 3 к 4 состоянию по Чансу). В конечном итоге ткань становится нечувствительной к действию раздражителей большой интенсивности, реакция на которые могла бы привести к ее повреждению. Подобный эффект воспроизводится при различных патогенных воздействиях на организм и рассматривается как защитная биохимическая реакция, обеспечивающая реализацию восстановительных синтезов при стрессе. Особая ценность такого подхода – в использовании параметров энергетического обмена, полученных *in vitro*, в качестве диагностических критериев физиологического состояния клетки *in vivo*.

Таким образом, налицо биохимическая модель регуляции энергетического обмена при возбуждении и торможении в норме и при патологии с учетом возможности переключения метаболических путей по ходу деятельности. Исследования структуры митохондрий в клетках при усилении внешних воздействий, приводящих к резкой активации функционального состояния клетки, свидетельствуют об их корреляции с биохимическими изменениями, которые выглядят как циклические переходы от компактной формы органелл, характерной для покоя, через стадию сильного набухания вплоть до потери структуры.

2.5 Адениннуклеотидный пул и его роль в поддержании энергетического гомеостаза в клетке

Среди богатых энергией соединений основную долю составляют компоненты адениннуклеотидной системы. Основной составляющей пула является АТФ, образующийся главным образом в реакциях ОФ митохондриальной дыхательной цепи и частично – в гликолитических реакциях. АТФ играет ключевую роль не только в энергообеспечении всех энергозависимых процессов клеточной деятельности, но и в механизме реализации запасенной энергии в любой вид работы (механическую, синтетическую, электрическую, осмотическую, тепловую). К минорным компонентам адениннуклеотидного пула от-

носятся АДФ, АМФ и циклический АМФ (цАМФ). Изменения соотношения различных адениннуклеотидов может отражать изменение функционального состояния клетки. Так, например, базальное, фоновое содержание АТФ в изолированных гепатоцитах и в интактной печени в зависимости от функционального состояния клеток колеблется в диапазоне 2,4-3,0 мкмоль/г вл. массы (табл. 1). Особенности функционального состояния организма влияют и на фоновое содержание АДФ, и на отношение $[АТФ]/[АДФ]$. Максимальные значения АТФ и отношения $[АТФ]/[АДФ]$ и минимальные значения АДФ характерны для «покоящихся» клеток печени (гепатоциты из печени сытых животных, богатых гликогеном). В покоящихся гепатоцитах с истощенным пулом гликогена (клетки из печени крыс, голодавших 24 часа), внутриклеточное содержание АТФ было на 13% меньше. Активация энергозависимых процессов (например, синтеза мочевины или реакций 2-й стадии биотрансформации) приводит к снижению содержания базального внутриклеточного уровня АТФ на 13-18% сравнительно с покоящимися гепатоцитами, увеличению содержания АДФ (на 20-120%) и уменьшению отношения $[АТФ]/[АДФ]$ в 2 раза и более (Дудченко, 2003; Дудченко, Лукьянова, 2003, 2004; Дудченко и др., 1993б; Lukyanova, Dudchenko, 1999; Lukyanova et al., 2010).

Таблица 1 – Влияние различных метаболических состояний на концентрацию АТФ и АДФ (ммоль/г вл. массы) в свежееизолированных гепатоцитах крыс (по Дудченко, 2003)

Условия эксперимента	АТФ, ммоль/г вл.массы	%	АДФ ммоль/г вл.массы	%	АТФ/АДФ
С, неактивированные	2,92±0,25	100	0,57±0,23	100	5,1
С + СМ	2,41±0,25	83	0,69±0,1	121	3,5
Г, неактивированные	2,54±0,37	87	0,79±0,24	138	3,2
Г + СМ	2,42±0,38	83	1,01±0,26	177	2,4
Г + МКС	2,43±0,30	83	1,26±0,23	221	1,9
Г + Фр	2,48±0,27	85	1,05±0,15	184	2,3
Г + СМ + МКС+ Фр	2,40±0,28	82	1,06±0,23	184	2,2

Примечание:

Гепатоциты инкубировали в среде, содержащей 200 мкмоль O_2

С – гепатоциты с неистощенным пулом гликогена («сытые»);

Г – гепатоциты, истощенные по гликогену («голодные»);

СМ – гепатоциты с активированным синтезом мочевины;

МКС – гепатоциты с активированным микросомальным окислением;

Фр – гепатоциты с активированным метаболизмом фруктозы.

2.6 Структурно-функциональные особенности митохондрий животных с разной резистентностью к гипоксии и их роль в формировании «функционально-метаболического портрета»

Известно, что в любой популяции неинбредных животных, а также человека существуют особи с различной резистентностью к гипоксии. Эта особенность, впервые по-видимому установленная Пьюршотом (Purshottam, Chosh, 1970), была в свое время подробно исследована и описана Березов-

ским и нами (Березовский, 1975, 1978; Лукьянова, 1981, 1997, 2000, 2004а, 2011; Лукьянова, Коробков, 1981). Благодаря этим работам получены данные о широком круге функционально-метаболических параметров, по которым были выявлены четкие индивидуальные различия между высокоустойчивыми (ВУ) и низкоустойчивыми (НУ) к гипоксии животными, которые проявляются на системном, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

Индивидуальные различия в чувствительности к гипоксии и ее переносимости определяются при подъеме животных в барокамере на критическую высоту (Березовский, 1975, 1978; Лукьянова, 1981, 1997, 2004). Популяционное распределение животных по значениям времени жизни (Вж) в барокамере на критической высоте отличаются от нормального. Кривая этого распределения, как правило, характеризуется наличием нескольких пиков, и ее форма может меняться в зависимости от сезона года.

Различия в величине Вж между крайними группами могут составлять 3-10 раз и более, и на этот параметр могут влиять не только время года, но и гормональный статус, пол животного, условия их содержания и пр. У НУ крыс Вж на критической высоте (11 000-11 500 м) составляет не более 3 минут, у ВУ – от 10 до 60 минут и выше. Эти две группы животных различаются также значениями времени потери позы на критической высоте и временем восстановления позы после возвращения на землю: у НУ особей оба параметра достоверно ниже, чем у ВУ. Таким образом, НУ сравнительно с ВУ быстрее теряют способность к координации двигательной функции, раньше принимают боковое положение в условиях острой гипоксии, у них раньше развиваются патологические типы дыхания и агональное состояние. Тем не менее, в условиях реоксигенации они скорее восстанавливают способность удерживать позу нормального животного и двигательную активность (Лукьянова, 1981, 1997, 2000, 2004 а, 2011; Лукьянова и др., 2009; Лукьянова, Коробков, 1981; Lukyanova, 1996, 1997).

Различия в чувствительности к острой гипобарической гипоксии между отдельными особями в инбредных линиях существенно меньше, чем среди беспородных животных. Так среди крыс линии Вистар 85-90% животных являются НУ к гипоксии. Наоборот, среди крыс линии Август преобладают ВУ особи. Все это говорит в пользу того, что различия в резистентности к гипоксии определяются не только фенотипическими, но и генотипическими особенностями организма.

Двум крайним типам животных с неодинаковой чувствительностью к острой кислородной недостаточности (ВУ и НУ) соответствуют два принципиально разных *«функционально-метаболических портрета»*, в основе которых лежат прежде всего характерные различия в эффективности работы энергетического аппарата, а также в состоянии ЦНС, нейро-гуморальной регуляции, стресс-активирующих, стресс-лимитирующих систем, кислород-транспортной функции крови, в состоянии мембран. Так, например, суммарное потребление кислорода ВУ к гипоксии крысами в нормоксических условиях ($21\% \text{ O}_2$ во вдыхаемом воздухе) при температуре 23°C составляет в среднем $19,5 \pm 1,2$ мл $\text{O}_2/\text{кг}/\text{мин}$, а НУ – $16,3 \pm 1,0$ мл $\text{O}_2/\text{кг}/\text{мин}$. Следовательно, обмен веществ у ВУ животных не снижен по сравнению с НУ, что могло бы быть причиной их высокой толерантности к гипоксии.

Первой работой, посвященной изучению особенностей работы митохондриальных ферментных комплексов в мозге ВУ и НУ животных, было исследование Дудченко А.М. (1976). Ему удалось показать, что в условиях нормоксии существуют различия в кинетических характеристиках некоторых ферментов дыхательной цепи. В монографии Березовского В.А. (1978) отмечается неодинаковое использование субстратов окисления в мозге ВУ и НУ крыс. Наши исследования в период 1978-2010 гг. (Дудченко, 2003; Дудченко и др., 1976, 1995, 1996; Лукьянова, 2002, 2004 в; Лукьянова, Атабаева и др., 1993; Лукьянова, Коробков, 1981; Lukyanova, 1997, 2004, 2010; Lukyanova, Dudchenko, 1999) не только подтвердили, но и существенно расширили и дополнили представления об особенностях аэробного энергетического обмена в двух крайних по чувствительности к гипоксии группах животных – ВУ и НУ.

Оба фенотипа характеризуются принципиально различными базовыми ультраструктурными и функциональными характеристиками митохондрий и свойствами ферментов дыхательной цепи. Так в митохондриях КГМ мозга интактных крыс исходно одинаковая эффективность ОФ в нормоксических условиях достигается за счет большей скорости фосфорилирующего дыхания и большей напряженности энергообразующих процессов у НУ сравнительно с ВУ, что свидетельствует об исходно меньшей экономичности у них этого процесса (Дудченко и др., 1993 а; Лукьянова и др, 1991 б). В пользу этого вывода говорит и тот факт, что при окислении митохондриями мозга НУ-крыс НАД-зависимых субстратов скорость переноса электронов в дыхательной цепи является предельной и при увеличении функциональной нагрузки может привести к истощению ее резервных возможностей, чего не наблюдается в мозге ВУ животных (Дудченко и др., 1993, 1994; Лукьянова, 1997; Чернобаева и др., 1993).

Показано, что в мозге НУ-крыс максимальная активность (V_{max}) и значения K_m (NADH) для митохондриальной NADH-цитохром c - редуктазы (НЦР) в нормоксических условиях достоверно ниже, чем в мозге ВУ-крыс (табл. 1) (Дудченко и др., 1993, 1993а; Дудченко, Лукьянова, 2003; Лукьянова и др., 1999, 2000). Аналогичные, хотя и менее выраженные различия в кинетических параметрах характерны для ЦХО мозга интактных ВУ и НУ животных (табл. 1). Это означает, что в мозге НУ крысы данные ферменты быстрее насыщаются субстратом (НАДН или цит c) и медленнее его окисляют, что и может быть причиной более низкой в этом случае активности, например, НАДН-оксидазного пути в мозге НУ животных, и более быстрой его инактивации.

О возможной различной окислительной способности НАД-зависимого (субстратного) участка дыхательной цепи в митохондриях КГМ ВУ и НУ животных свидетельствуют данные об особенностях кинетических параметров некоторых ферментов дыхательной цепи. Так установлено, что базовые значения K_m и V_{max} сукцинат-цитохром c -редуктазы (МФК II) и цитохром c -оксидазы (МФК III) в КГМ НУ и ВУ крыс не различались. Однако значения K_m и V_{max} ротенончувствительной НАДН-цитохром c -редуктазы (МФК I) в мозге НУ были достоверно меньше, чем в мозге ВУ крыс (табл. 2) (Дудченко и др, 1996, Лукьянова и др., 2007). Это подтверждает гипотезу, согласно которой НАДН-цитохром c -редуктаза митохондрий мозга ВУ крыс имеет более эффективную стехиометриче-

скую регуляцию при высоких концентрациях НАДН, чем аналогичный фермент у НУ животных. Благодаря этому фермент в мозге ВУ крыс может эффективно работать в более широком диапазоне концентраций НАДН, т.е. при концентрациях, насыщающих аналогичный ферментный комплекс в КГМ НУ крыс. Аналогичные различия в кинетических характеристиках митохондриальных ферментов существуют в печени ВУ и НУ крыс (Белоусова и др., 1992; Дудченко, 2003; Дудченко, Лукьянова, 2004; Дудченко и др, 1993 б).

Таблица 2 – Кинетические характеристики МФК I-IV в неокортексе низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии крыс в условиях нормоксии (Лукьянова и др., 2007)

	параметр	Нормоксия, абсолютн. значения		ВУ/НУ %
		НУ	ВУ	
NADH-Q-OXRed	Vmax	0,061	234**	0,14
	Kmax	2,90	460**	13,30
Succ-Cyt c Red	Vmax	0.10	110	0,11
	Kmax	116,00	114	132,00
COX	Vmax	0,67	110	0,77
	Kmax	1,67	200*	3,33

Примечание: NADH-Q-OXRed – NADH-CoQ цитохром *c* оксидоредуктаза; Succ-Cyt *c* Red – сукцинат-цитохром *c* редуктаза; COX – цитохром *c* оксидаза.

Максимальная активность – Vmax, ед. опт. плотн. х мин⁻¹ х мг⁻¹ белка;

Значения кажущейся Km (x10⁻⁵M).

* – P < 0,01; ** - P <0,001.

Существование различий в кинетических свойствах ферментов дыхательной цепи у ВУ- и НУ-крыс свидетельствует о том, что данное явление генетически обусловлено, что может определять особенности «метаболического портрета» животного.

Таким образом, энергетический обмен включается в качестве одного из ведущих факторов, определяющих формирование индивидуальной резистентности организма.

Несмотря на то, что базовая активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) достоверно не отличалась у сравниваемых фенотипов, для нейронов КГМ ВУ крыс характерно более высокое содержание этого фермента и его субстрата сукцината (табл. 3), что предполагает более значительный вклад сукцинатоксидазного окисления в митохондриальную энергопродукцию у ВУ крыс в условиях нормоксии. Обращает внимание большая разница в базовом содержании в КГМ крыс субъединицы МФК I – NDUFV2 (табл. 2). В митохондриях КГМ ВУ животных оно было почти в 2 раза выше, чем у НУ, что может отражать большую значимость НАД-зависимого окисления в этой ткани у данного типа животных.

Различия в активности МФК I и МФК II проявляются и в миокарде ВУ и НУ особей. Однако в этом случае вклад НАД-зависимого пути окисления субстратов в энергетический обмен миокарда ВУ крыс в нормоксических условиях значительно меньше, чем у НУ. Активность же сукцинатоксидазного окисления, отражающая базовое состояние МФК II, наоборот, исходно

больше в миокарде ВУ, чем НУ. Именно последнее может являться причиной более высокой резистентности миокарда ВУ на ранних стадиях гипоксии: сократительная функция миокарда ВУ животных нарушается при гипоксии позже и выражена слабее, чем у НУ крыс и это коррелирует с меньшим падением в нем содержания АТФ (Корнеев, Лукьянова, 1987; Корнеев и др., 1990; Лукьянова, 1997, 2004 б, в).

Таблица 3 – Содержание в КГМ крыс в нормоксических условиях некоторых субъединиц ферментов митохондриальных комплексов МФК I-IV (Лукьянова, Кирова, Германова, 2018)

Тип крыс	NDUFV2 (МФК I) ОДЕ	SDHA (МФК II) ОДЕ	Cyt b (МФК III) ОДЕ	COX1 (МФК IV) ОДЕ
ВУ	35±1,05	158±4,58	103±2,99	42±1,09
НУ	19±0,61	126±4,03	81±2,27	35±1,02
ВУ/НУ, %	184#	125#	127#	120#

(# – $p < 0,05$).

НУ – низкоустойчивые; ВУ – высокоустойчивые

МФК I – NDUFV2; МФК II – SDHA; МФК III – Cyt c; МФК IV – COX 1.

Аналогичные различия в кинетических характеристиках митохондриальных ферментов были получены для печени ВУ и НУ крыс.

Генотипически обусловленные различия между ВУ и НУ животными подтверждаются исследованиями белкового спектра мозга (Богомолов, Лукьянова, 1992). При картировании белков головного мозга у ВУ и НУ животных среди 339 выделенных белковых фракций было выявлено 15, проявляющих изменчивость в разных вариантах опытов. В 9 из них вариабельность носила особо выраженный характер. При этом в КГМ ВУ и НУ крыс между вариабельными белковыми фракциями были обнаружены количественные и качественные различия. Так, фракция с характеристиками $M_r/pI = 56/6,2$ (молекулярная масса, kD/изоэлектрическая точка) была достаточно выражена в КГМ НУ крыс, в то время как в КГМ ВУ животных она отсутствовала. Содержание белка фракции 63/6,15 в КГМ НУ было в 2 раза выше сравнительно с ВУ, а содержание белка фракции 32/6,4, наоборот, было достоверно ниже и т.д. Таким образом, белковые спектры КГМ интактных ВУ и НУ крыс исходно неодинаковы.

В митохондриях нейронов КГМ интактных ВУ и НУ животных выявлены также существенные базовые структурно-морфологические различия. Для нейронов КГМ интактных ВУ крыс характерно повышенное количество мелких митохондрий сравнительно с НУ (в 3,5 раза) (Павлик и др., 2017), что предполагает повышенный биогенез этих органелл и отражает большую интенсивность ОФ. Мелкие митохондрии, как известно, более активны и вовлечены в физиологически необходимый процесс обновления их популяции в клетке, контролируемый митохондриальной динамикой (биогенезом, митофагией, слиянием и делением) (Бакеева и др., 1977; Струков, Серов, 1995; Chan D. 2006, 2012; Chen, Chan, 2005, 2009; Liesa et al., 2009; Karbowski, Youle, 2003; Wiesner et al., 1999). Митохондрии ней-

ронов КГМ ВУ крыс характеризуются также более высокой плотностью (менее выраженной просветленностью матрикса), большим числом крист, более высоким содержанием митохондриальных ферментов и сукцината (Павлик и др., 2017). Число крист в митохондриях является маркером их функциональной активности и отражает площадь распределения дыхательных комплексов и интенсивность протекающего в них ОФ (Wiesner et al, 1999). Увеличение числа крист митохондрий – свидетельство возрастающих функциональных потребностей клетки; уменьшение их числа либо их деформация встречаются при пониженной активности митохондрий. Плотные митохондрии – функционально более активные (высокоэнергизованные). Просветленные митохондрии – низкоэнергизованные (Иванченко, Твердохлеб, 2014; Павлик и др., 2017; Твердохлеб, 1998).

Все это предполагает более высокую базовую функциональную активность энергетического аппарата нейронов КГМ ВУ крыс сравнительно с НУ.

Более высокая электронная плотность матрикса митохондрий в КГМ интактных ВУ животных сравнительно с НУ может быть обусловлена более высокой экспрессией белков митохондриальных ферментов, что также согласуется с данными о более высоком содержании белка всех исследованных субъединиц митохондриальных комплексов, участвующих в транспорте электронов (МФК I-IV), и АТР-синтазы (табл. 3). Эта особенность может отражать исходно более высокую активность электрон-транспортной функции дыхательной цепи в нормоксических условиях в КГМ ВУ животных сравнительно с НУ (Дудченко, Лукьянова, 2004; Павлик и др., 2017; Lukyanova, Dudchenko, 1999; Lukyanova et al. 2010).

Таким образом, в нормоксических условиях существуют фенотипические ультраструктурные и функциональные различия между митохондриями КГМ ВУ и НУ крыс. В совокупности они говорят о большей мощности дыхательной цепи КГМ контрольных ВУ животных сравнительно с НУ, а также о том, что энергетический обмен может включаться в качестве одного из факторов, определяющих формирование индивидуальной резистентности организма к гипоксии.

Различия в организации работы митохондриальных ферментов в тканях животных с разной резистентностью к гипоксии, определяющие особенности их аэробного энергетического обмена, коррелируют с многими другими особенностями их функционально-метаболического портрета, которые, по-видимому, генотипически обусловлены.

Установлено, что ВУ и НУ животные различаются особенностями функционирования центральной нервной системы. Так, например, при подъеме животных в барокамере на критическую высоту динамика ЭЭГ и спектров ее мощности принципиально различается у ВУ и НУ крыс (Малышев и др., 1996). У первых – это фазный процесс с постепенно нарастающим сдвигом в область медленноволновой компоненты ЭЭГ, максимально выраженным на высоте 9-10 тыс. м. У вторых фазность отсутствует, и сдвиг в область медленноволновых колебаний проявляется гораздо раньше – на высоте 5-8 тыс. м.

При этом выявлена прямая корреляция между типом нервной системы животного и потерями макроэргов в мозговой ткани при острой ги-

поксии (Крапивин и др., 1991; Ливанова и др., 1991а, б; Лукьянова, 1989, 2004б, в; Livanova et al., 1992; Lukyanova, 1997, 2002, 2013, 2014; Lukyanova et al., 2010).

Считается, что НУ – это животные, преимущественно обладающие: слабым типом нервной системы; повышенной возбудимостью; повышенной эмоциональной реактивностью; менее развитым внутренним торможением; быстрой истощаемостью возбудительного процесса; более выраженной судорожной готовностью; большей длительностью клонической фазы. При этом они характеризуются сниженной способностью к физическим нагрузкам, что, в свою очередь, может быть результатом гиперкалиемии и метаболического ацидоза.

В отличие от этого для ВУ животных характерно: сниженная возбудимость; сниженная тревожность; умеренная агрессивность; более выраженное внутреннее торможение; малая чувствительность к любым провоцирующим воздействиям; склонность к социальному доминированию; устойчивость к нембуталовому наркозу; на острую гипоксию, ишемию мозга, отравление СО ВУ реагируют тормозной реакцией.

ВУ и НУ животные принципиально различаются и по биохимическим свойствам крови. Именно в крови впервые были найдены два маркера генетической устойчивости животных к гипоксии: различия в типах гемоглобина и концентрации K^+ . Проведенные нами исследования биохимического состава крови у интактных ВУ и НУ крыс (Лукьянова, 2004 б, в; Lukyanova, 2002, 2004) показали, что НУ животные отличаются от ВУ (табл. 4):

- более низкими значениями pO_2 крови и артериовенозной разницы, что говорит о **повышенной напряженности кислород-транспортной системы у НУ животных;**

- более низкими значениями pH и более высокими значениями pCO_2 , что свидетельствует о **признаках базового респираторного ацидоза у НУ животных.** Сочетание такой тенденции с более низкой концентрацией бикарбонатов и дефицитом буферных оснований (BE), отражающим наличие в крови значительного количества недоокисленных продуктов, позволяет говорить о том, что у **НУ крыс исходно выражена склонность к метаболическому ацидозу;**

- **гиперкалиемией**, которая, как известно, сопровождает метаболический ацидоз и может быть связана с почечной недостаточностью;

- **тенденцией к гипергликемии и гиперлипидемии**, что может быть результатом влияния метаболического ацидоза и гиперкалиемии на ключевые ферменты углеводного и жирового обмена и причиной сниженной способностью НУ к физическим нагрузкам;

- **более высокими значениями активности некоторых ферментов крови** – маркеров состояния плазматических мембран (аспартатаминотрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы), что свидетельствует, с одной стороны, об исходно увеличенной проницаемости мембран у этих животных и, с другой, об их склонности к застойным явлениям, способствующим развитию тканевой гипоксии, недостаточности сердечной деятельности и нарушению функции коры головного мозга.

Таблица 4 – Значения различных биохимических показателей крови в нормоксических условиях у крыс

параметры	ВУ (абс)	НУ (абс)	НУ / ВУ %
pO ₂ , мм рт. ст.	65,7 ± 11,0	50,0 ± 6,3	76*
pH, мэкв/л	7,261 ± 0,02	7,141 ± 0,02	98
pCO ₂ , мэкв/л	34,2 ± 2,2	39,5 ± 1,9	115
HCO ₃ ⁻ , мМ	20,5 ± 4,5	15,2 ± 0,5	74*
BE, мэкв/л	-8,5 ± 1,2	-12,2 ± 0,08	147*
K ⁺ , мкмоль/л	6,60 ± 0,05	6,96 ± 0,09	105
Глюкоза, мг/дл	120,4 ± 8,6	137,0 ± 0,7	114
Триглицериды, мг/дл	129,0 ± 31,6	229,8 ± 44,5	178*

ВУ – высокоустойчивые; НУ – низкоустойчивые к гипоксии животные

Таким образом, такие базальные показатели кислотно-щелочного состава крови, как pO₂, pCO₂, pH, BE и K⁺, характеризующие ее способность к транспорту кислорода, и функционирования систем, ответственных за поддержание кислородного гомеостаза, являются **прогностически значимыми** и могут использоваться для оценки резистентности животных к гипоксии. Это заключение имеет принципиальное значение, так как известно, что внутриклеточный редокс-потенциал регулирует активность ключевых ферментов углеводного и жирового обмена. Следовательно, можно ожидать, что наличие базального метаболического ацидоза у НУ животных может быть предпосылкой для существенных отличий у них в содержании в крови глюкозы и метаболитов жирового обмена. И действительно, оказалось, что для НУ животных характерны гипертриглицеринемия и повышенное содержание глюкозы в крови, что может косвенно свидетельствовать об исходно более низком уровне обмена у них жирных кислот и углеводов. В пользу последнего говорят и данные о более низком содержании молочной кислоты в миокарде и мозге НУ крыс и более низкой активности лактатдегидрогеназы в мозге и печени НУ сравнительно с ВУ животными (Lukyanova, 1996).

Гиперлипидемия, гипергликемия, увеличение содержания буферных оснований в крови являются признаками, свидетельствующими не только о существенных отклонениях в обмене веществ, но и факторами, способствующими возникновению сахарного диабета и диабета напряжения, ожирения, тиреотоксикоза, атеросклероза, коронарного тромбоза, кетоацидоза. Таким образом, особенности базального обмена НУ животных позволяют рассматривать их как группу с выраженной предрасположенностью к развитию различных патологий, в том числе сердечно-сосудистых заболеваний.

Следовательно, наличие базального метаболического ацидоза, гипертриглицеринемия и повышенное содержание глюкозы в крови у НУ животных могут являться показателями исходно более низкого уровня обмена у них жирных кислот и углеводов. В пользу последнего говорят и данные о более низком содержании молочной кислоты в миокарде и мозге НУ крыс и более низкой активности ЛДГ в мозге и печени НУ сравнительно с ВУ животными (Лукьянова, 2004 б, в). Следует отметить, что у людей также по-

казаны группы, для которых характерны явления фонового ацидоза, коррелирующие с низкой резистентностью к гипоксии и сниженной физической работоспособностью (Березовский, 1975; Бресткин, 1968).

Все описанные функционально-метаболические особенности, характерные для группы НУ животных, как известно, сопровождают состояние стресса и отражают перенапряжение симпато-адреналовой и кислород-транспортной систем. Об этом же свидетельствует и высокий уровень глюкозы в крови НУ животных, который может быть связан с усилением выработки контринсулярных гормонов, в частности катехоламинов и глюкокортикоидов (Березовский, 1975, 1978). Все это указывает на возможность существенных различий в состоянии симпато-адреналовой системы у ВУ и НУ животных (Табл. 5).

Таблица 5 – Различия в базальном содержании некоторых нейромедиаторов в тканях интактных ВУ и НУ крыс (Лукиянова, 2004 б, в)

нейромедиаторы*	гипоталамус	КГМ	надпочечники	миокард
норадреналин	1,3	2,9	1,0	1,6
адреналин	4,5	4,7	0,9	3,3
серотонин	2,7	2,4	-	-

* – выражено в виде отношения ВУ/НУ

Это подтверждается также экспериментальными данными о базовых различиях между ВУ и НУ животными в массе тимуса и надпочечников (у первых она соответственно на 32 % и 38 % меньше, чем у вторых), а также о базальном содержании в тканях катехоламинов, которое значимо больше у ВУ животных (табл. 6).

Таблица 6 – Различия в массе тимуса и надпочечников у высокоустойчивых (ВУ) и неустойчивых (НУ) к гипоксии крыс

Масса	ВУ	НУ	ВУ/НУ
Тимус (мг)	345 ±35	517 ±87	0,67**
Надпочечники (мг)	36 ±3	58 ±3	0,62*
Масса тела (г)	356 ±23	330 ±32	1,10

Из этих данных следует также вывод об исходно различном состоянии тонуса симпато-адреналовой системы у ВУ и НУ животных, которое, в свою очередь, может быть причиной метаболического ацидоза и повышенного напряжения кислород-транспортных систем и в силу этого иметь особое значение в регуляции снабжения клетки кислородом.

Все эти типологические функционально-метаболические различия между ВУ и НУ животными особенно четко выявляются при предъявлении им стресс-нагрузок, которые сопровождаются увеличением тонуса адренергической системы.

Так, например, острая гипоксическая нагрузка, которая развивается по типу стресса, приводит к усилению выраженности метаболического ацидоза и увеличению в крови недоокисленных продуктов, а также гиперкалиемии, как у ВУ, так и НУ. Однако у ВУ, в отличие от НУ животных, увеличивается pO_2 крови и артерио-венозная разница по кислороду, что говорит о включении у них мощных компенсаторных механизмов, позволяющих животным преодолевать стрессовую нагрузку. У НУ крыс, наоборот, pO_2 крови и артерио-венозная разница снижаются и, следовательно, срочные компенсаторные механизмы оказываются недостаточными в этих условиях для ослабления последствий гипоксического воздействия (Лукиянова, 2004 б, в).

Математический анализ влияния подъема животных в барокамере на критическую высоту на частоту дыхания и ЧСС также подтверждает, что регуляторные влияния симпатической нервной системы на фоновый ритм сердца и обратная корреляционная связь между увеличением ЧСС и временем жизни в группе НУ крыс выражены гораздо сильнее, чем у ВУ животных. Эти данные позволяют предполагать, что при подъеме в барокамере у ВУ и НУ животных имеют место разнонаправленные изменения тонуса симпатической нервной системы. У НУ он первично снижается, а затем увеличивается, в то время как у ВУ он вначале остается без изменений, а затем снижается. Кроме того, функциональный резерв регуляции сердечного ритма используется у них более экономно.

Дополнительно к вышесказанному имеются свидетельства об исходно увеличенной у НУ животных проницаемости биологических мембран, их склонности к застойным явлениям, которые также могут способствовать развитию тканевой гипоксии. Так в крови НУ животных исходно повышена активность аспаратаминотрансферазы, креатинкиназы и лактатдегидрогеназы. В условиях острой гипобарической гипоксии их содержание увеличивается еще больше, особенно у НУ крыс. При этом происходит подавление жирового обмена и усиление трансаминазных реакций, а также увеличение содержания аммония в крови – продукта этих реакций.

Различия между ВУ и НУ животными касаются и состояния трех ведущих регуляторных систем, обеспечивающих доставку кислорода к тканям: системы дыхания, состояния сердечно-сосудистой системы и транспортной функции крови.

Для НУ крыс характерна более высокая возбудимость дыхательного центра сравнительно с ВУ, быстрая его истощаемость, повышенная фоновая частота дыхания, увеличенная реактивность внешнего дыхания в условиях гипоксии, способность к более быстрой декомпенсации. У этих же животных отмечена склонность к фоновой тахикардии: к резкой, сравнительно с ВУ, активации при острой гипоксии сердечной деятельности с последующей быстрой декомпенсацией. При этом для них характерно первичное усиление кровотока с развитием в последующем острой сосудистой недостаточности.

В совокупности все эти особенности функционально-метаболического портрета НУ животных могут быть причиной возникновения таких заболеваний, как диабет, атеросклероз, коронарный тромбоз, кетоацидоз и др. Возможность их развития у НУ животных выражена в гораздо большей степени, чем у ВУ, что характеризует их как группу «риска».

Таким образом, существует выраженная *сцепленность параметров, характеризующих особенности организации работы дыхательной цепи, и «функционально-метаболический портрет» животных*. Для НУ особей, отличающихся меньшей эффективностью работы энергетического аппарата мозга и сердца в нормоксических условиях, характерны более быстрая утомляемость и сниженная работоспособность. Эти функционально-метаболические особенности дополняются особенностями состояния симпатoadреналовой системы, выраженными признаками метаболического ацидоза, повышенной напряженностью кислород-транспортной системы, гиперкалиемией, гиперлипидемией, гиперкальциемией, повышенной проницаемостью мембран, меньшей активностью антиоксидантной системы мозга.

2.7 Регуляторная роль митохондрий в жизнедеятельности организма (митохондриальная физиология)

Из приведенного выше материала очевидно, что, благодаря энергосинтезирующей функции, митохондрии принимают активное участие *в клеточном и системном метаболизме*.

Митохондрии содержат ряд ключевых, лимитирующих ферментов биосинтеза стероидов, синтеза гема, секреции желудочного сока, а также выполняют координирующую роль в процессах внутриклеточного обмена кальция и калия. Они участвуют в зависящей от мембранного потенциала генерации белков, которые содержат гем и порфириновые фрагменты. Установлена роль митохондрий в биогенезе, генетической функции ДНКмх (Butow, Avadhani, 2004; Chandel, 2014; Chandel, Schumacker, 1999; Michiels, 2004).

В силу того, что внутренняя митохондриальная мембрана проницаема только для H_2O , O_2 , CO_2 и NH_3 , другие гидрофильные метаболиты и все органические биологически важные ионы транспортируются через нее благодаря наличию специфических каналов и белковых переносчиков. Среди последних наиболее важны переносчики фосфата, адениннуклеотидов (АТФ и АДФ) и дыхательных моно-, ди- и трикарбоксилатов.

Митохондрии являются одним из важнейших элементов клетки, участвующих в регуляции внутриклеточного Ca^{2+} -гомеостаза. Кальций, как известно, является вторичным мессенджером, участвующим в запуске многих физиологических процессов в клетке. Клеточная сигнализация Ca^{2+} имеет фундаментальное значение для большинства форм клеточных «состояний активации»: сигналы Ca^{2+} регулируют большинство процессов, которые связаны с повышенными потребностями в энергии: сокращении, подвижности, электрической возбудимости – все они требуют повышенного энергоснабжения и обычно связаны с увеличением цитозольной концентрации Ca^{2+} . Митохондрии играют важную роль в этом процессе, являясь основной буферной системой для ионов кальция. Они способны изменять внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} как локально, так и во всей цитоплазме. Именно баланс в работе митохондриальных систем входа и выхода кальция обеспечивает поддержание внутриклеточного кальциевого гомеостаза и функционирование митохондрий в норме и при патологиях.

Повышение концентрации Ca^{2+} в матриксе митохондрий в свою очередь активирует ключевые ферменты дыхательной цепи (пируватдегидрогеназу, цитратдегидрогеназу и α -кетоглутаратдегидрогеназу), что приводит к увеличению продукции АТФ (Kunz, 2001; Saks et al., 2001; Territo et al., 2001). Скорость этого процесса, контролируемого несколькими различными митохондрио-зависимыми молекулярными структурами, зависит от мембранного потенциала органелл и концентрации этих ионов в цитозоле (Gunter et al., 2004).

Между цитозолем и митохондриями поддерживается постоянный интенсивный поток неорганических ионов и метаболитов. Благодаря этому между ними осуществляется система регуляторного взаимодействия.

Наряду с этим имеются доказательства триггерной роли митохондрий в *межклеточных взаимодействиях и системной регуляции* (Brunk et al., 2002; Butow et al., 2004; Duchen, 2004; Gnaiger et al., 2005; Gusy et al., 2006; Felty et al., 2005; Kusnetsov et al., 2004; Lukyanova, 2004; Lukyanova et al., 2008; McDonald, 2002; Michiels, 2004; Nichols, 2000; Pierson, 2000).

Митохондрии обеспечивают энергией физиологические функции, необходимые для жизнедеятельности организма. К ним относятся прежде всего сократительная функция сердца, гладкой мускулатуры пищеварительного тракта, сосудов, легких, поддержание ионных градиентов в возбудимых тканях, аккумуляция секретируемого материала в везикулах, поддержание гормональной и нейротрансмиттерной функции, процесс оплодотворения и эмбриогенеза, адаптация к стрессам. Это объясняет триггерную роль митохондриального аппарата в *клеточно-системном метаболизме и системной регуляции* (Brunk, Terman, 2002; Butow, Avadhani, 2004; Duchen, 2004; Felty, Roy, 2005; Gnaiger, 2005; Gusy, Schumacker, 2006; Kusnetsov et al., 2004; Lukyanova et al., 2008; Lukyanova, 1997, 2002, 2004; Lukyanova et al., 2003, 2008; McDonald, 2002; Michiels, 2004; Nichols, Samantha, 2000; Orrenius et al., 2006; Pierson, 2000; Semenza, 2002).

Очевидна ведущая роль митохондрий в регуляции кислородного гомеостаза организма. На *системном* уровне именно митохондрии определяют концентрационный градиент кислорода, поступающий из окружающей среды в клетку, и являются конечным звеном взаимодействия с молекулярным кислородом. Вдыхаемый нами воздух в конечном счете отражает состояние и запросы митохондрий в кислороде, так как именно они являются главными его потребителями: до 98% кислорода, поступающего в организм, связано с митохондриальным дыханием. В результате этого процесса в клетках различных тканей млекопитающих генерируется до 80-90% АТФ.

Есть мнение, что благодаря этой функции, от которой зависит жизнеспособность и жизнедеятельность аэробных организмов, в процессе эволюции были созданы сложнейшие физиологические системы доставки кислорода к митохондриям и поддержания в клетке оптимальной оксигенации (акт дыхания, легочная система переноса кислорода, система сердечно-сосудистой циркуляции, система массопереноса крови, эритроциты, гемоглобин) (Pierson, 2000).

Организация системы пищеварения, включая утилизацию продуктов питания и их последующую поэтапную ферментативную переработку, также продиктована, прежде всего, необходимостью снабжения субстратами реакций митохондриального окисления и окислительного фосфорилирования (Brun et al., 2000; Michiels, 2004; Zhu et al., 1999).

С функцией митохондрий связаны такие процессы, как рост, старение, реакция на температуру, апоптоз, секреция инсулина в β -клетках, формирование адаптивных реакций (Brunk et al., 2002; Butow et al., 2004; Chandel et al., 1999, 2000; Di Lisa et al., 2001; Felty et al., 2005; Kusnetsov et al., 2004; McDonald, 2002; Michiels, 2004; Nichols, 2000; Peers et al., 2001; Porwol et al., 2001; Nishimura et al., 2001; Voos et al., 2002, Zhu et al., 1999). Эффект «физиологического разобщения» в митохондриях выполняет функцию термогенератора при термогенезе.

Возрастные изменения функциональной активности митохондрий играют важнейшую роль в физиологии целостного организма (Orrenius et al., 2006; Sato et al., 2006). При биологическом старении происходит снижение тканевого потребления кислорода и базальных уровней метаболизма (в частности уровня ОФ). Заметно уменьшается поток электронов через МФК I-III и II-III внутренней митохондриальной мембраны (Shoffner et al., 1991; Boffoli et al., 1996; Desai et al., 1996; Muller-Hocker et al., 1996).

Все это позволяет говорить о новой эре в исследованиях, связанных с митохондриями, и появлении нового раздела биологии – **«митохондриальной физиологии» (mitochondria physiology)** (Gnaiger, 2005).

Глава III РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТОЧНОМ СИГНАЛИНГЕ ПРИ ГИПОКСИИ (МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ПРИ КИСЛОРОД-ДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЯХ)

3.1 Срочная системная реакция на гипоксию

Способность реагировать на изменения парциального давления кислорода в окружающем воздухе свойственна большинству аэробов, начиная с одноклеточных. В процессе эволюции по мере увеличения содержания кислорода в атмосфере чувствительность организмов к недостатку кислорода увеличивалась и одновременно совершенствовались механизмы, ответственные за поддержание кислородного гомеостаза. В результате этого у млекопитающих уже имеется сложная система *срочных и долгосрочных* компенсаторных реакций, благодаря которым при гипоксии обеспечивается сохранение стационарного уровня кислорода в капиллярах, необходимого для наиболее эффективного снабжения им тканей и клеток.

Как уже отмечалось, тот факт, что дефицит кислорода в окружающей среде оказывает огромное влияние на жизнедеятельность организма, стало очевидным лишь в конце XIX века. Вплоть до 70-х годов XX столетия изучались преимущественно системные физиологические механизмы гипоксии. В результате был накоплен огромный банк данных, позволивший создать классификации гипоксических состояний по функционально-метаболическим признакам, установить особенности их проявления на системном уровне. Были выявлены их сложная динамика и их зависимость от доставки кислорода к клетке, связанная с функцией кровоснабжения; вовлеченность широкого спектра функционально-метаболических систем (дыхательной, сердечно-сосудистой, транспортной систем, нейро-гормональной регуляции); множественность лимитирующих участков; наличие полиорганных, мультифункциональных и неспецифических нарушений, проявление которых зависит от длительности и тяжести гипоксического воздействия; отсутствие выраженных нозологических признаков.

В результате сформировались представления *о системных* механизмах, вовлекаемых в ответную реакцию организма на гипоксию, лежащих в основе огромного количества форм гипоксических состояний. На их основе Баркрофтом (Barcroft, 1925) была сформулирована первая классификация гипоксий, получившая в свое время широкое распространение. При этом было выделено три типа гипоксических состояний: 1) аноксическая гипоксия, характеризующаяся сниженными парциальным давлением кислорода во вдыхаемом воздухе и содержанием кислорода в артериальной крови; 2) анемическая гипоксия, в основе которой лежит уменьшение кислородной ёмкости крови при нормальном парциальном давлении кислорода в альвеолах и его напряжении в крови; 3) застойная гипоксия, возникающая вследствие недостаточности кровообращения при нормальном содержании кислорода в артериальной крови.

Питерс и Ван-Слайк (1932) предложили различать и четвёртый тип — гистотоксическую гипоксию, которая возникает в присутствии экзогенных ядов, которые делают невозможным использование тканями кислорода. Взятая за основу эта классификация впоследствии постепенно усложнялась. Так в 1949 г. расширенный вариант причинной классификации был предложен И.Р. Петровым. Позже модификацией классификаций гипоксий занимались А.З. Колчинская, Н.А. Агаджанян, С.Н. Эфуни, А.А. Башкиров, П.Ф. Литвицкий и др. (Агаджанян, Чижов, 2003; Зайчик, Чурилов, 2001; Колчинская, 1992; Литвицкий, 2002).

В нашу задачу не входит подробное рассмотрение и анализ классификаций гипоксий. Следует лишь отметить, что во всех классификациях учитывались этиологические признаки, определяющие развитие гипоксических состояний. Были выделены *экзогенная* и *эндогенная* гипоксии. В **первом** случае причиной гипоксии являются внешние факторы: снижение концентрации кислорода в окружающей среде (при нормальном барометрическом давлении или при его уменьшении, как это имеет место в горах или в барокамере, а также при отравлении экзогенными ядами. Во **втором** случае причиной являются патологические процессы, приводящие к нарушению дыхания, кровоснабжения и транспортной функции крови, а также сопутствующие им эндотоксикозы, благодаря которым развивается гистотоксическая форма гипоксии.

Было выделено несколько форм клинического проявления кислородной недостаточности, из которых главными являются *дыхательная (респираторная)* гипоксия, связанная с дыхательной недостаточностью легких; *циркуляторная* гипоксия, обусловленная недостаточностью кровоснабжения органов и тканей; *гемическая* гипоксия, связанная с уменьшением емкости крови, главным образом в связи со снижением концентрации гемоглобина. На практике чаще всего имеют дело со *смешанным* типом гипоксий, для которой характерно взаимопотенцирование отдельных ее форм, сопутствующих развитию тяжелых экстремальных и даже терминальных состояний.

Сравнительно недавно в классификации гипоксий появились новые формы: *гипероксическая* гипоксия; гипоксия *напряжения* или *перегрузки*; *физиологическая* гипоксия, лежащая в основе обычной рабочей деятельности.

Эффекты гипоксий могут различаться в зависимости от скорости нарастания дефицита кислорода, длительности его воздействия и степени кислородной недостаточности. Так известны *молниеносная, острая, подострая и хроническая* разновидности гипоксии. По критерию выраженности расстройств жизнедеятельности организма можно различать *легкую, среднюю (умеренную), тяжелую, критическую (летальную)* формы гипоксии. При этом степень тяжести гипоксии описывается, как правило, разной степенью нарушений нервно-психической деятельности, расстройствами функции сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а также изменениями газового состава крови и кислотно-щелочного равновесия. При всех формах гипоксии происходит снижение напряжения кислорода в крови (*гипоксемия*). Отсутствие кислорода в окружающей среде (*аноксия*) способствует развитию *аноксемии в присутствии экзогенных ядов* (отсутствие кислорода в крови).

Патогенез всех этих форм гипоксий подробно изложен в различных руководствах и учебниках (Зайчик, Чурилов, 2001; Литвицкий, 2002). Он опи-

сывается функционально-метаболическими признаками, формирующимися на системном уровне. В этом случае регуляция кислородного гомеостаза организма выполняется за счет изменений скорости кровотока в капиллярах, депонирования кислорода в эритроцитах и изменения свойств кривой диссоциации оксигемоглобина, которая отражает способность гемоглобина насыщаться кислородом в легких и отдавать его в ткань. Приведение в действие этих факторов, которые увеличивают содержание кислорода в капиллярах и тем самым ускоряют процесс его диффузии, осуществляется, главным образом, за счет усиления функции органов внешнего дыхания, кровообращения и пр. Все эти компенсаторные реакции являются важнейшими физиологическими приспособительными механизмами при недостатке кислорода. Таким образом, в ответной реакции целого организма на снижение pO_2 участвуют наиболее жизненно важные системы.

Во второй половине XX века появились данные о связи кислородного снабжения с энергетическим обменом при формировании гипоксии. Это сразу же отразилось на определении гипоксии. Одно из наиболее ранних определений системной гипоксии с учетом ее зависимости от процессов биологического окисления было дано Чарным А.М. (1961): «Патологическое состояние, наступающее в организме при неадекватном снабжении тканей и органов кислородом или при нарушении утилизации в них кислорода, получило в литературе название тканевой гипоксии». Таким образом, этот термин включает обширный комплекс процессов, протекающих в организме, обусловленных кислородной недостаточностью.

Согласно Siesjö (1978), гипоксия – это состояние, при котором происходит снижение содержания кислорода окружающей среды до уровня, недостаточного для поддержания функции, метаболизма и структуры.

Березовский В.А. определил гипоксию как «несоответствие между метаболическим запросом и его энергетическим обеспечением», которое сопровождается временным выходом показателей кислородного гомеостаза (pO_2 , O_2 , pH, концентрация недоокисленных продуктов, щелочной резерв и др.) за пределы флуктуаций, очерченных границами физиологической зоны» (Березовский, 1979).

Действительно, при снижении парциального давления в окружающей среде увеличивается минутный объем дыхания и альвеолярная вентиляция. Повышается парциальное давление кислорода в альвеолярном воздухе и артериальной крови, компенсируя начальное снижение pO_2 . Если этих механизмов недостаточно и ткани испытывают недостаток кислорода, мобилизуются другие существующие резервы: в процесс газообмена включаются не вентилировавшиеся ранее альвеолы, увеличивается частота дыхания, улучшаются вентиляционно-перфузионные отношения, уменьшается объем шунтирующего кровотока малого круга. Одновременно активируется сердечно-сосудистая система: увеличивается частота сердечных сокращений, минутный объем кровообращения и ударный объем сердца, происходит перераспределение крови с преимущественным снабжением наиболее нуждающихся в кислороде тканей – головного мозга и миокарда. Возрастает объем циркулирующей крови за счет мобилизации резервов из депо – селезенки. Включаются в актив-

ную деятельность ранее закрытые капилляры, возрастают транспортные возможности гистогематических барьеров. Все эти и ряд других срочных компенсаторно-адаптивных реакций во всех звеньях систем, обеспечивающих процесс дыхания и кровообращения, способствуют сохранению кислородного гомеостаза.

Однако под воздействием чрезмерных по силе возмущений происходит дальнейшее увеличение амплитуды ответных реакций организма и выход регуляторных параметров (pO_2 , pCO_2 , pH, концентрации недоокисленных продуктов, щелочной резерв и пр.) за пределы компенсаторных возможностей организма. Ответная реакция становится не адекватной воздействию и происходит вывод системы за пределы допустимых значений в зону дискоординации функций, дезинтеграции органов и гибели организма. Это наглядно демонстрируется по реакции на гипобарическую гипоксию нарастающей тяжести, моделируемой в условиях барокамеры.

В зависимости от уровня pO_2 в артериальной крови можно условно выделить четыре последовательные стадии ответных реакций различных функциональных систем, отражающих степень тяжести развития гипоксии на системном уровне (Коваленко, Черняков, 1972; Сиротинин, 1974, 1981; 1972; Siesjo, 1978).

I степень – $pO_2 = 60-45$ мм рт. ст. (40-30% 78-65% от содержания кислорода в воздухе, либо в артериальной крови эквивалентно примерно высоте 5000 м); появляются первые видимые признаки изменений пульса и дыхания и нарушения мышечной координации.

II степень – $pO_2 = 50-45$ мм рт. ст. (30-25% от нормоксического содержания кислорода, высота около 7400 м): предкоматозное состояние, нарушение психики и эмоций, шатающаяся походка, ослабление и потеря чувствительности, сердечная слабость от мышечных усилий.

III степень – $pO_2 = 40-20$ мм рт. ст. (25-12% от нормоксического содержания кислорода; высота более 10 000 м): бессознательное состояние, церебральная кома, ригидность мышц, «стеклянные глаза», может произойти остановка сердца. Симптомы проходят при вдыхании кислорода.

IV степень – $pO_2 = 20$ мм рт. ст. (12% кислорода и менее; высота более 11 000 м): кома, дыхание крайне замедленное или остановка дыхания, смерть.

Таким образом, системная ответная реакция на недостаток кислорода – *фазный* процесс, зависящий от силы воздействия. При этом изменения ведущих функциональных систем организма и потребления кислорода отсутствуют в широком диапазоне значений pO_2 . Это положение вошло в физиологическую литературу под названием «правила» (или закона) Пфлюгера. Потребление кислорода целым организмом начинает снижаться только при уменьшении pO_2 среды на 62-73% от максимального (порог чувствительности организма к гипоксии) исходного. В этом случае даже сравнительно небольшие его изменения приводят к быстро нарастающим нарушениям различных показателей функциональной активности. На ранних стадиях гипоксии возможно увеличение потребления кислорода, коррелирующее с усилением общего дыхания и частоты сердечных сокращений.

Все это предполагает наличие системных сенсорных механизмов, позволяющих дифференцировать градуальные изменения в содержании кислорода в окружающей среде и сопряженных с сигнальной преобразова-

тельной системой, активирующей функциональный ответ и реализацию физиологической реакции организма на гипоксию, и прежде всего, синтеза энергии и специфические для гипоксии транскрипционные факторы. Благодаря точному регуляторному согласованию работы этих систем обеспечивается доставка достаточного количества кислорода к каждой из 10^{14} клеток здорового взрослого организма человека, необходимая для поддержания кислородного гомеостаза.

Физиологический ответ организма на острую гипоксию реализуется на *системном* уровне в течение секунд. Первичными хеморецепторами артериального pO_2 являются каротидные клубочки – небольшие органы, расположенные в области бифуркации каротидной артерии, передающие с помощью нейромедиаторов (катехоламинов) в центры коры головного мозга раздражающие сигналы, которые приводят к увеличению дыхания и сердечных сокращений (Dejours, 1962; Lopez-Borneo et al., 2003; Prabhakar, 2000). Ведущая регуляторная роль в формировании срочных механизмов системной адаптации организма к гипоксии, и прежде всего защитно-приспособительных реакций, направленных на предупреждение или устранение гипоксии, сохранение обмена веществ и функционально-метаболического гомеостаза принадлежит симпато-адреналовой и гипофизарно-надпочечниковой системам. При усилении тяжести гипоксии симпато-адреналовая и гипофизарно-надпочечниковая системы играют важную роль в возникновении срыва защитно-приспособительных систем организма.

3.2 Тканевая (биоэнергетическая) гипоксия

В начале XX века благодаря прямым определениям количества кислорода, поглощаемого кусочками тканей, было доказано, что потребление кислорода тканевыми препаратами из окружающей среды может снижаться в присутствии токсических веществ (ядов), даже если он имеется в ней в избытке. Впервые это явление было описано русским ученым П.М. Альбицким (1905) и названо «*тканевой гипоксией*». В 1932 г. это же явление (неспособность тканей утилизировать кислород) было описано Д. Питерсом и Д. Ван-Слайком и включено в первую классификацию гипоксий, предложенную Баркрофтом (1925) под названием «гистотоксическая анемия». Первоначально и Альбицкий, и Ван-Слайк подразумевали под тканевой гипоксией исключительно только нарушение (подавление) клеточного дыхания под влиянием экзогенных ядов (KCN, азида, CO, нитрита натрия и пр.). В литературе это явление известно также под названием *гистотоксической или цитотоксической гипоксии*. Впоследствии оказалось, что все перечисленные выше яды являются ингибиторами цитохромоксидазы (ЦХО) – терминального фермента дыхательной цепи. Поэтому под гистотоксической гипоксией стали понимать инактивацию ЦХО экзогенными токсическими веществами.

В настоящее время мы знаем, что причиной тканевой гипоксии могут быть самые различные химические соединения, мишенью для которых являются различные участки дыхательной цепи (рис.11). Под их влиянием

может развиваться угнетение активности электрон-транспортной функции любого участка дыхательной цепи: субстратного (НАДН-оксидазного или сукцинатоксидазного) и цитохромного.



Рисунок 11 – Лекарственные препараты и яды – ингибиторы электрон-транспортной функции дыхательной цепи в различных ее участках

Таким образом, *тканевая гипоксия* может возникать при нормальном составе окружающей газовой среды и при нормальной деятельности кислород-транспортных систем. В этом случае кислород не может утилизироваться в процессах биологического окисления или утилизируется с меньшей эффективностью из-за нарушения функции митохондриальной дыхательной цепи.

Со временем были введены понятия «*первичная*» и «*вторичная*» тканевая гипоксия, что является очень условным. К «*первичной*» (цитотоксической) гипоксии, которая была выделена как самостоятельная форма гипоксии, были отнесены состояния, связанные с нарушением тканевого дыхания в результате токсического действия различных веществ экзогенного происхождения.

Ко «*вторичной*» тканевой гипоксии были отнесены нарушения дыхания, опосредованные недостаточностью кровообращения и доставки кислорода в клетку. Следует при этом иметь в виду, что уже в 1933 г. Тангбом была установлена зависимость дыхания клеточных систем от концентрации кислорода, описываемая гиперболой. Много позже эти данные подтвердили Бендер и Кисс, которые установили, что зависимость VO_2/pO_2 подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен (1955). Таким образом было показано, что наряду с системной регуляцией, практически *любые клетки* млекопитающих

обладают чувствительностью к кислороду: при снижении концентрации O_2 на 60-70% от исходного скорость его потребления клетками начинает прогрессивно снижаться. В связи с этими исследованиями в научную терминологию вошли понятия о критическом напряжении кислорода, (значения pO_2 , при которых начинаются изменения дыхания – K_{pO_2}) и о величине pO_2 , при которой дыхание биологического объекта уменьшается на 50% (кажущаяся константа Михаэлиса – $K_m(O_2)$).

К аналогичному явлению приводят также нарушение окислительных процессов, связанное с авитаминозами, белковым голоданием, эндокринными расстройствами, способствующими снижению синтеза ферментов дыхательной цепи, стресс, различные патологические состояния.

В настоящее время термин «*тканевая гипоксия*» сохраняется преимущественно в физиологической литературе, в то время как в работах, посвященных биоэнергетическим исследованиям, появился другой термин, – «*биоэнергетическая гипоксия*», который, однако, вначале являлся лишь синонимом термина «тканевая гипоксия». Джонс (Jones, 1984, 1985, 1986; Jones, Kennedy, 1986; Jones, Mason, 1978; Jones et al., 1990), автор этого термина, как и его предшественники, раскрывая механизм этого явления, рассматривал *биоэнергетическую гипоксию* как особую, самостоятельную форму гипоксии – результат нарушения активности цитохромоксидазы (ЦХО) – кислород-зависимого фермента терминального участка митохондриальной дыхательной цепи.

Однако, согласно данным Б. Чанса, ЦХО имеет очень высокое сродство к кислороду и низкие значения $K_m(O_2)$ (10^{-6} – 10^{-8} М) (Chance, Quistorf, 1977; Chance et al., 1975, 1979). Это означает, что фермент может сохранять активность в среде, содержащей следовые количества кислорода. В то же время известно, что даже в аноксических условиях содержание кислорода в крови составляет не менее 10^{-5} М. Следовательно кислородзависимая инактивация ЦХО не только в гипоксических, но даже в преданоксических условиях не должна происходить.

И действительно, в литературе давно уже приводятся факты, свидетельствующие о том, что нарушения энергетического обмена начинаются гораздо раньше, чем достигается критическая концентрация кислорода, приводящая к снижению его потребления, т.е. задолго до уменьшения активности ЦХО (*гипоксический парадокс*). Все это предполагает иные лимитирующие участки аэробного синтеза энергии при гипоксии.

3.3 Действие гипоксии на структурно-морфологический паттерн митохондрий

При гипоксии возникают четкие, закономерно развивающиеся изменения ультраструктуры клеток, причем определяющую роль в развитии патологических изменений в них играет повреждение митохондрий. Патология митохондрий носит, видимо, неспецифический характер и выражается в появлении нескольких типичных форм изменений, зависящих от длительности и тяжести гипоксического воздействия и/или скорости его развития: увеличении числа митохондрий, очаговом просветлении матрикса, частич-

ном или полном исчезновении крист, набухании, нарушении целостности внутренней мембраны и, наконец, фрагментации, уплотнении и накоплении в них инородных веществ. Все типы изменений могут быть обратимыми и необратимыми. Конечной стадией необратимых процессов является разрушение митохондрий с частичной или полной дезинтеграцией мембранных структур и потерей функций.

Одним из наиболее чувствительных к гипоксии органов является мозг. Поэтому описанные выше нарушения обмена веществ раньше всего проявляются в сфере высшей нервной деятельности и регуляции разнообразных физиологических процессов (дыхание, кровообращение и пр.). На втором месте по чувствительности к гипоксии после мозга стоят сердце и почки. Нарушения обмена веществ и структуры клеток при гипоксии проявляются в снижении их специфической функции и функции соответствующих органов и систем.

Все эти изменения вызывают каскад функционально метаболических нарушений, который на клеточном уровне приводит к нарушению ионного обмена и, прежде всего, K^+ и Ca^{2+} , изменению редокс-потенциала клетки и состояния мембран, их проницаемости и, наконец, нарушению энергетического обмена.

Имеется определенная неравномерность степени повреждения митохондрий не только в различных нейронах, но и в одной клетке, зависящая, по-видимому, от различной реактивности митохондрий в пределах одного нейрона: часть митохондрий повреждаются уже в ранние сроки после перенесенной гипоксии; другая часть может оставаться сравнительно сохранной длительное время даже в клетке с выраженными повреждениями других органелл. Это указывает на то, что даже при тяжелой гипоксии в нервных клетках длительное время сохраняются резервные возможности восстановления окислительного обмена за счет сохранившихся митохондрий. Тем не менее, поражение части митохондрий указывает на серьезные нарушения окислительного обмена в этих клетках, способных, в свою очередь, вызывать целый ряд изменений ультраструктуры нейрона.

Важную роль в механизмах патологических изменений нейронов играет не только дефицит кислорода, но и немедленно следующее за ним накопление недоокисленных продуктов, приводящее к нарушению внутриклеточного гомеостаза. Морфологическим выражением этого является изменение состояния внутриклеточных коллоидов и реакции органелл клеток, не связанных непосредственно с дыхательной функцией клетки. В первую очередь это касается органелл, обеспечивающих белоксинтезирующую функцию клетки (ядро, ядрышко, гранулярная сеть, рибосомы, полисомы, агранулярная сеть и пр.). Патологические изменения белоксинтезирующих структур начинаются с уменьшения числа полисом и рибосом, набухания и распада цистерн гранулярной сети, увеличения количества элементов агранулярной сети, активации ядра. Одновременно в цитоплазме клетки появляются многочисленные мелкие вакуоли, которые, видимо, формируются в результате распада липопротеидов цитоплазмы.

При гипоксической гипоксии на первый план выступают повреждения гранулярной сети, полисом и митохондрий. При ишемии более отчетливо выражена вакуолизация, которая сопровождается деструкцией внутриклеточных и окружающих клетку мембран. Характерной формой изменения

нервных клеток при гипоксии является появление «темных нейронов», отличающихся высокой электронной плотностью ядра и цитоплазмы в результате изменений липопротеидов цитоплазмы и кариоплазмы в сочетании с нарушением ультраструктуры мембранных систем клетки.

Степень и форма патологических изменений ультраструктуры нейронов при гипоксии определяются как прямым нарушением энергетического и окислительного обмена, так и вторичным нарушением некоторых видов их обмена, которые при гипоксии выступают на первый план в развитии структурных повреждений клетки и могут определять их обратимость или необратимость. При этом гипоксия должна достигнуть определенной степени, чтобы вызвать изменения ультраструктуры, которые наступают лишь вслед за срывом функционально-метаболического гомеостаза клетки. И лишь затем развиваются характерные реактивные сдвиги, которые либо могут купироваться резервными возможностями клетки, либо (при нарастании тяжести процесса) переходить в патологические изменения.

Имеются существенные структурно-функциональные различия между митохондриями КГМ крыс с разной толерантностью к гипоксии не только в нормоксических, но и в гипоксических условиях.

Для КГМ ВУ крыс в норме характерно более высокое содержание митохондрий с темным матриксом; более плотная упаковка крист – свидетельство возрастающих функциональных потребностей клетки, а также большее количество мелких митохондрий (Павлик и др., 2017). Мелкие митохондрии вовлекаются в физиологически необходимый процесс обновления их популяции в клетке, контролируемый митохондриальной динамикой (биогенезом, митофагией, слиянием и делением). Характерное для нормоксических условий большое количество мелких митохондрий в КГМ ВУ крыс указывает на повышенную метаболическую активность органелл у этих животных, а также на большую интенсивность у них ОФ по сравнению с НУ крысами. Все это позволяет интерпретировать данные об ультраструктуре митохондрий в условиях нормоксии как доказательства более высокой базовой функциональной активности энергетического аппарата митохондрий КГМ ВУ сравнительно с НУ (Павлик и др., 2017).

Исследование зависимости ультраструктуры митохондрий от тяжести гипоксического воздействия показало, что в условиях *in vivo* эти органеллы тонко дифференцируют градуальные изменения в содержании O_2 в окружающей среде.

Так, например, наиболее «слабое» однократное 30-минутное гипоксическое воздействие (снижение содержания O_2 во вдыхаемом воздухе до 14% относительно атмосферного) не влияло на ультраструктурный паттерн митохондрий КГМ ВУ, но приводило к заметным его изменениям в митохондриях КГМ НУ животных, а именно: увеличению количества мелких митохондрий, свидетельствующего об увеличении их метаболической активности; повышению плотности матрикса; увеличению, по сравнению с нормоксией, органелл с плотноупакованными кристами. Все эти изменения являлись маркерами срочной адаптации к гипоксии, коррелируют с усилением ОФ, активацией синтеза нуклеиновых кислот и увеличением клеткой энергопотребления. Увеличение популяции мелких электронно-плотных митохондрий облегчает контроль за их интактностью,

позволяя удалять поврежденные митохондрии с помощью митофагии и элиминации их лизосомами (Павлик, и др., 2017).

Таким образом, даже режим «слабой» 30 минутной гипоксии индуцирует у НУ особей срочные ультраструктурные адаптивные реакции, способствующие увеличению метаболической активности митохондрий в КГМ и усилению степени их энергизации, благодаря чему ультраструктурный паттерн их митохондрий становился сходным с митохондриями КГМ ВУ.

После 30-минутного сеанса гипоксии «средней» тяжести (10% O_2 относительно атмосферного) в КГМ обоих типов крыс практически полностью исчезали светлые митохондрии и преобладали митохондрии с плотно упакованными кристами. При этом в КГМ НУ крыс почти в 4 раза по сравнению с контролем увеличивалась популяция мелких электронно-плотных митохондрий, аналогичных тем, которые появились после слабого гипоксического воздействия. В отличие от этого, в КГМ ВУ крыс количество мелких электронно-плотных митохондрий, которое было достаточно высоким уже в контроле, при данном гипоксическом режиме не менялось (Павлик и др., 2017).

Эти данные свидетельствуют об усилении функциональной активности митохондрий КГМ в условиях данного гипоксического режима, более выраженном у НУ животных. В пользу этого вывода говорят и данные о сопутствующей срочной экспрессии транскрипционного гипоксического фактора HIF-1 α в КГМ, достигающей в этих условиях своего максимума и о мобилизации других срочных адаптационных сигнальных механизмов (Кирова и др., 2012; Lukyanova, Kirova, 2015). Признаки нарушений ультраструктуры митохондрий в этом случае отсутствуют.

Однако после 30-минутного «тяжёлого» гипоксического воздействия (8% O_2 относительно атмосферного) в митохондриях КГМ обоих типов животных появлялись значимые изменения ультраструктуры. Характерным для этого режима было снижение числа мелких митохондрий: в КГМ НУ оно снижалось относительно предыдущего случая, но оставалось в 2 раза более высоким, нежели в контроле. У ВУ крыс снижение было более выраженным: число мелких митохондрий снижалось не только относительно предыдущего случая, но и относительно контроля (более чем в 2 раза) (Павлик, и др., 2017).

Еще одной особенностью этого гипоксического режима было резкое увеличение (почти в 2 раза) в КГМ обоих видов животных числа протяженных митохондрий. У некоторых митохондрий появлялись «перетяжки». В КГМ НУ животных такие «мегамитохондрии» отличались более электронно-плотным матриксом по сравнению с митохондриями ВУ крыс. Появление мегамитохондрий рассматривается как адаптационная реакция нейронов на деэнергизацию в условиях структурно-функционального напряжения клетки при действии сверхсильных экстремальных факторов (Заболотский и др., 1999).

Все в целом свидетельствует о функциональном перенапряжении работы дыхательной цепи в условиях действия тяжелой гипоксии, приводящему к появлению ультраструктурных повреждений митохондрий КГМ, более выраженных у НУ животных.

Таким образом, в условиях *in vivo* митохондрии КГМ отвечают на градуальные изменения в содержании кислорода в окружающем воздухе ха-

ракторными изменениями ультраструктуры, зависящими от тяжести гипоксического воздействия и отражающими увеличение эффективности работы дыхательной цепи. В диапазоне 14-10% O_2 эти изменения направлены на поддержание энергетического статуса организма и на формирование защитных, приспособительных реакций адаптивного характера. Однако при снижении содержания O_2 до 8% в ультраструктуре митохондрий появляются признаки повреждения, коррелирующие с дезэнергизацией клетки и нарушениями других адаптивных сигнальных систем.

Особенности ультраструктуры митохондрий КГМ у ВУ и НУ крыс в нормоксических и гипоксических условиях подтверждают развиваемую нами концепцию, что двум крайним типам животных с неодинаковой толерантностью к острой кислородной недостаточности соответствуют два принципиально разных «функционально-метаболических портрета», в основе которых лежат характерные различия в эффективности работы энергетического аппарата, в состоянии ЦНС и нейро-гуморальной регуляции, в состоянии мембран и рецепторного аппарата.

Исследования морфологических и ультраструктурных изменений в миокарде желудочков сердца также показывают сравнительно раннюю реакцию внутриклеточных структур даже на умеренную гипоксию. При этом обращают на себя внимание признаки нарушения реологии крови и состояния микрососудов в виде стазов в капиллярах, агрегации эритроцитов, нередко резкого сужения просвета капилляров набухшими эндотелиальными клетками, значительным усилением пиноцитоза. Кардиомиоциты сохраняют свою нормальную структуру, но отмечается снижение гранул гликогена и умеренно выраженная гомогенизация некоторых митохондрий. Наряду с этим в большинстве незначительно набухших митохондрий, имеющих овальную форму, наблюдаются небольшие очаги деструкции крист с вымыванием матрикса. В то же время появляются кардиомиоциты с перераспределением митохондрий в виде их скоплений в различных частях клетки. Такие митохондрии – набухшие, матрикс их вымыт, большинство крист фрагментировано (Розова и др., 2015). Таким образом, в период, когда гипоксия вызывает умеренный энергетический дефицит в кардиомиоцитах, дистрофические изменения в митохондриях уже имеют место.

При тяжелой гипоксии на фоне выраженного периваскулярного отека и периваскулярных кровоизлияний митохондрии были набухшими, матрикс большинства из них просветлен, кристы фрагментированы. В ядрах многих кардиомиоцитов повышалось количество хроматина и изрезанность контуров. В саркоплазме уменьшалось количество гранул гликогена, увеличивалось количество липидных включений, было много рибосом. Имелись также кардиомиоциты с выраженным отеком саркоплазмы, резким уменьшением в ней гранул гликогена и рибосом, набухшими митохондриями с гомогенизацией крист, очаговой деструкцией и полной гомогенизацией оргanelл. Анализ других параметров в этот период позволяет говорить о том, что при этом имело место недостаточное энергетическое обеспечение как сократительного акта, так и метаболических процессов в миокарде, которое сопровождалось снижением активности некоторых ключевых ферментов окислительного метаболизма (Розова и др., 2015).

3.4 Регуляторная роль аденилатного пула в условиях гипоксии

Главным показателем нарушения энергосинтезирующей функции при гипоксии является внутриклеточный уровень АТФ, снижение которого при дефиците O_2 наблюдается во всех органах. Согласно данным Siesjo (1978), зависимость $[АТФ]/[O_2]$ в мозге человека, также как и зависимость дыхания от концентрации O_2 , описывается гиперболической кривой, причем область стационарных значений АТФ сохраняется в очень широком диапазоне концентраций O_2 , а линейная часть зависимости может быть зарегистрирована лишь при очень низких концентрациях кислорода. Эта закономерность была подтверждена другими исследованиями, проведенными на тканевых и клеточных моделях (КГМ, нейроны, миокард, печень, гепатоциты), что позволило установить общность ответной реакции биоэнергетического аппарата на действие гипоксии в различных тканях (Дудченко, Лукьянова, 2003; Дудченко, Чернобаева и др, 1993; Лукьянова, Дудченко, Чернобаева, 1999, 2000; Лукьянова, Романова, Чернобаева, 1991б; Лукьянова, Чернобаева, Романова, 1995; Романова, Чернобаева, Лукьянова, 1991; Чернобаева и др 1990, 1993 1995; Lukyanova, Dudchenko, 1999).

Учитывая, что свободные адениннуклеотиды выполняют ряд важнейших регуляторных функций в общем метаболизме клетки, для оценки энергетического обмена важно знать закономерности изменения всех компонентов аденилатного пула в широком диапазоне значений концентрации кислорода. Тем не менее, вопрос о том, в какой степени АТФ и другие параметры аденилатного пула могут быть использованы в качестве предикторов гипоксии, долгое время оставался открытым. Спорными являлись и представления о прогностической ценности отношений $[АТФ]/[АДФ]$ и $[АТФ]/[АМФ]$, а также суммы аденилатов и энергетического заряда, параметров, широко используемых в специальной литературе для оценки энергетического статуса клетки.

При изучении влияния гипоксии на различные параметры аденилатного пула было выявлено **несколько различных областей их значений, зависящих от концентрации кислорода** (Дудченко, 2003; Дудченко, Лукьянова, 2003, 2004; Lukyanova, Dudchenko. 1999).

1) Область физиологической регуляции энергетического обмена (нормоксия), для которой характерны стабильные, стационарные значения всех компонентов аденилатного пула (АТФ, АДФ и АМФ), а также суммы аденилатов ($[АТФ]+[АДФ]+[АМФ] = \Sigma АН$) и энергетического «заряда» по Аткинсону, показателя мощности энергетических превращений ($[АТФ]+[1/2АДФ]/[АТФ]+[АДФ]+[АМФ] = ЭЗ$). Для этой области характерна сбалансированность системы: равновесность между АТФ-синтезирующими и АТФ-утилизирующими реакциями, максимально высокие стабильные значения отношений АТФ/АДФ и АТФ/АМФ при сохранении высокой функциональной активности организма – клетки (область **высокосопряженной энергетической регуляции**).

2) Область появления первых признаков ослабления энергетической регуляции (при снижении концентрации O_2 на 30-35%). При этом наблюдается относительно небольшое (10%) снижение содержания внутриклеточного АТФ, связанного с усилением реакций дефосфорилирования,

о чем говорит увеличение содержания АДФ и снижение отношения АТФ/АДФ. Достоверные изменения в содержании АМФ в начале этого периода отсутствуют и поддержание энергетического гомеостаза (синтез АТФ и его расхода) в клетках регулируется, видимо, преимущественно отношением АТФ/АДФ. При этом значения Σ АН и ЭЗ сохраняются стабильными.

3) Область смены регуляторных механизмов энергетического обмена (при снижении концентрации O_2 на 50% и [АТФ] на 15-20% от исходного). В этом случае содержание АДФ перестает существенно изменяться, но начинает увеличиваться внутриклеточное содержание АМФ, что приводит к снижению отношения АТФ/АМФ. Все указывает на возможное обращение аденилаткиназной реакции и на усиление в этот период регуляторной роли отношения АТФ/АМФ в энергетическом гомеостазе клетки при сохранении стационарных значений суммы аденилатов и энергетического заряда. При этом наблюдается компенсаторная активация гликолиза и снижение интенсивности анаболических реакций.

4) Область дизрегуляции в системе адениннуклеотидов (при снижении концентрации O_2 на 70-80% и [АТФ] на 20-30% от исходного). Для этой области характерно появление падающего участка в зависимостях [АТФ]/[O_2], [АДФ]/[O_2], Σ АН/[O_2] и ЭЗ/[O_2] и гипернакопление АМФ. Одновременно происходит гиперактивация гликолиза, усиление свободно-радикальных процессов, индукция апоптоза, потеря жизнеспособности клеток. Все это свидетельствует о **низкоэнергетическом сдвиге и переходе к формированию патологического процесса**, сопровождающегося нарушением жизнедеятельности клетки (Дудченко, Чернобаева, и др., 1993 а, б).

Таким образом, **кинетические зависимости параметров аденилатного пула от концентрации кислорода и прежде всего отношение [АТФ]/[O_2] свидетельствуют о фазном характере процесса и являются прогностическими критериями степени тяжести гипоксии** (предикторами как ранних, так и поздних нарушений энергетического обмена при гипоксии), и при их комплексном анализе так же, как и их отношений, возможно выявление различных стадий и регуляторных механизмов процесса.

Очевидно также, что оба отношения: и [АТФ]/[АДФ], и [АТФ]/[АМФ] – выступают в качестве регуляторов синтеза АТФ, однако их роль последовательно меняется на разных стадиях гипоксии. Это снимает вопрос (Хватова и др., 1987) о том, какое из этих отношений имеет большую прогностическую значимость в условиях дефицита кислорода, и подтверждает целесообразность проведения комплексных исследований всех параметров аденилатного пула для оценки степени гипоксических повреждений.

Анализ кинетических кривых зависимости [АТФ]/[O_2] позволяет также выявить **критическую концентрацию кислорода для АТФ** (концентрация, при которой начинается снижение внутриклеточного уровня АТФ).

Следует отметить, что особенности динамики компонентов аденилатного пула в условиях нарастающего дефицита кислорода различались в тканях ВУ и НУ к гипоксии крыс. Так градиент уменьшения содержания АТФ, также как и степень снижения уровня АТФ были выражены больше в тканях НУ. Более резкое падение содержания АТФ в тканях НУ крыс наблюдалось и в стадию декомпенсации. Индивидуальные различия касались и динамики содержания АДФ: увеличение концентрации АДФ на ранней стадии ги-

поксии в тканях НУ было выражено меньше, а последующее ее снижение в стадию декомпенсации – больше, чем в тканях ВУ (табл. 7).

Таблица 7 – Зависимость значений $АТФ_{50}^*$ в гепатоцитах ВУ и НУ крыс от концентрации кислорода (по Дудченко, 2003)

длительность гипоксии, мин	$[O_2]_{ВУ}$	$[O_2]_{НУ}$	$[O_2]_{НУ/ВУ}$
10	2,9	1,2	0,4
30	5,0	9,5	1,9
60	6,0	12,0	2,0
90	12,0	14,8	1,2
120	9,5	15,7	1,8

* $АТФ_{50}$ – концентрация кислорода (мкМ) при которой в гепатоцитах ВУ и НУ крыс происходит снижение уровня АТФ на 50% .

Различия в реакции этих параметров на гипоксию в тканях ВУ и НУ крыс свидетельствуют о том, что **энергетический обмен является механизмом, участвующим в формировании индивидуальной резистентности клетки к дефициту кислорода.**

Изменения в пуле адениннуклеотидов при гипоксии предшествуют изменениям других функционально-метаболических параметров, контролирующих жизнедеятельность клетки. Первыми страдают энергозависимые процессы (например, электрогенная функция электровозбудимых клеток, такие анаболические процессы, как синтез мочевины, реакции 2-й стадии биотрансформации) (Дудченко, 2003; Дудченко, Лукьянова, 2004). Специально проведенные исследования позволили показать, что для того, чтобы этот процесс начался, снижение внутриклеточного уровня АТФ должно составлять всего 10-20% от нижней границы физиологической нормы (критическая концентрация АТФ для энергозависимых функций). Угнетение функции развивается стремительно (*сигмоидальная* зависимость функции от АТФ). Компенсаторная роль гликолиза в качестве поставщика АТФ эффективна лишь в период 1-й стадии биоэнергетической гипоксии. В терминальный период, несмотря на гиперактивацию гликолиза, последний не способен обеспечить восстановление фонда АТФ, необходимого для поддержания специфической функциональной активности клетки, падение которой обусловлено нарушением аэробных процессов.

Увеличение проницаемости мембран и активация свободно-радикальных процессов, в том числе и усиление процессов перекисного окисления, наблюдаются только во время терминальной стадии энергетических нарушений и не диагностируются на более ранних стадиях.

3.5 Реакция электрон-транспортной функции дыхательной цепи на гипоксические воздействия

Зависимость параметров аденилатного пула от концентрации кислорода говорит о том, что работа дыхательной цепи в условиях гипоксии разной тяжести меняется.

В нормоксических условиях работа дыхательной цепи, как правило, связана с окислением НАД-зависимых субстратов – основного поставщика восстановительных эквивалентов для дыхательной цепи через МФК I, вклад которого, оцениваемый по потреблению кислорода, в интактных клетках, может составлять до 55-65% (рис. 12). Тем не менее 25-30% митохондриального дыхания в этих условиях связано с окислением сукцината (Лукьянова, Балмуханов, Уголев, 1982), содержание которого в матриксе митохондрий невелико (0.2-0.4 мМ) (Hems, Brosnan, 1970). Соотношение двух путей окисления (НАД-зависимого и сукцинатаоксидазного) в условиях нормоксии зависит главным образом от свойств основного фермента МФК I - НАДН-убихинон оксидоредуктазы, кинетические характеристики которого тканеспецифичны и резко различаются у интактных животных с неодинаковой чувствительностью к гипоксии (Lukyanova, 1997). Так в КГМ ВУ гипоксии крыс значения V_{max} и K_m (НАДН) этого фермента в нормоксических условиях достоверно выше, чем у НУ крыс, что определяет неодинаковую у двух типов животных окислительную способность НАД-зависимого участка дыхательной цепи и соотношение активностей МФК I/ МФК II (Дудченко, 1976, 2003; Дудченко и др. 1995, 1996, 2003, 2004; Лукьянова, 1981, 1997, 2004).

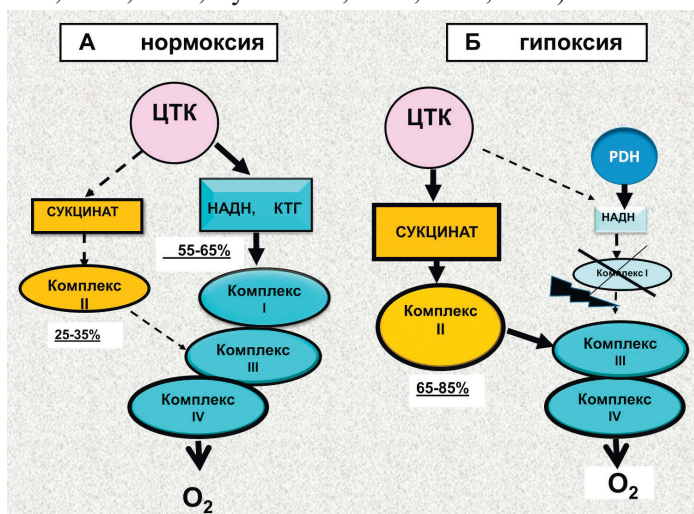


Рисунок 12 – Репрограммирование работы дыхательной цепи: переключение от окисления НАД-зависимых субстратов (комплекс I) при нормоксии (А) на окисление сукцината (комплекс II) при гипоксии (Б).

(А) Нормоксия: высокая активность комплекса-I (55-65% митохондриального дыхания), низкая активность комплекса-II (25-35% митохондриального дыхания).

(Б) Гипоксия: низкая активность комплекса-I, активация комплекса-II (65–85% митохондриального дыхания)

В 1981-1984 гг. нами была сформулирована концепция, согласно которой реакция митохондриального аппарата на нарушение оксигенации представляет собой сложный многоступенчатый процесс, фазный характер которого зависит от силы и длительности гипоксического воздействия (Лукьянова, 1981, 1986, 1997, 2000, 2002, 2004, 2011; Lukyanova, 2004, 2013, 2014-2015). Динамика этого фазного процесса может быть описана следующим образом:

I Стадия. Изменения электрон-транспортной функции дыхательной цепи начинаются не на цитохромном, а на субстратном (НАД-зависимом) участке. В ответ на снижение концентрации кислорода происходит **вначале кратковременная активация электрон-транспортной функции МФК I**, которая может сопровождаться усилением синтеза АТФ. При этом происходит изменение кинетических характеристик основного фермента комплекса (увеличение V_{\max} ротенончувствительной НАДН-цитохром c оксидоредуктазы) и связанное с этим явлением усиление потока электронов от НАД-зависимых субстратов, а также увеличения содержания АТФ и усиления функциональной активности клеток: импульсной активности нейронов, сократительной активности миокарда, способности гепатоцитов к энергозависимому синтезу мочевины (Белоусова, Дудченко, Лукьянова, 1992; Власова и др., 1978; Дудченко, Белоусова, Лукьянова, 1996; Дудченко, Лукьянова, 1995; Корнеев, Лукьянова, 1987; Лукьянова, 2004 б, 2011; Лукьянова, Атабаева, Шепелева, 1993; Лукьянова, Дудченко, Белоусова, 1994; Лукьянова, Дудченко, Чернобаева, 2000; Лукьянова, Клейменова и др., 1991; Лукьянова и др., 2007; Lukyanova, 2002).

Процесс отражает **срочный компенсаторный механизм мобилизации базовых энергетических ресурсов клетки** в условиях сравнительно небольших по силе внешних воздействий, в том числе и в условиях относительно небольшого снижения концентрации кислорода в окружающей среде (стадия первичной активации адаптационных процессов).

2 стадия – при усиливающемся гипоксическом воздействии происходят **подавление** электрон-транспортной функции МФК I и соответственно окисления НАД-зависимых субстратов, а также **компенсаторная активация альтернативных путей окисления субстратов** в дыхательной цепи, поставляющих восстановительные эквиваленты к МФК III и IV (рис. 12). Среди них особую роль играет МФК II (сукцинатоксидазный путь окисления). В условиях гипоксии он имеет термодинамические преимущества перед окислением НАД-зависимых субстратов ЦТК, и несмотря на то, что при этом сохраняются только два пункта фосфорилирования, высокие скорости реакции обеспечивают высокую энергетическую эффективность процесса в целом (Дудченко, 2003; Дудченко, Лукьянова, 2004; Кондрашова, 1976; Кондрашова, М, 1978; Кондрашова и др. 1973; Лукьянова, 1997, 2004 а, 2008, 2011; Маевский, 2000; Маевский, Гришина, 2017; Маевский и др., 1996, 2000, 2001 а, б; Hochachka, 1986; Hochachka et al., 1996; Kondrashova, 1993; Lukyanova, 1997, 2002. 2013, 2014; Maklashinas et al., 2002; Paddenberget al., 2003; Weinberg et al., 2000).

3 стадия, в отличие от первых двух, является **стадией декомпенсации (истощения)**. Она развивается при очень низких значениях pO_2 или длительном гипоксическом воздействии и сопровождается подавлением электрон-транспортной функции дыхательной цепи в области МФК III (цитохромы **b-c**), а затем и МФК IV, что приводит к дезэнергизации клетки (**терминальная стадия биоэнергетической гипоксии**).

Изменения в состоянии дыхательной цепи, возникающие при гипоксии, коррелируют с фазными изменениями в содержании различных компонентов адениннуклеотидного пула (см. раздел 3.4). Для первой, компенсатор-

ной стадии характерно относительно небольшое (в пределах 10%) снижение содержания АТФ, сопровождающееся увеличением внутриклеточного отношения АТФ/АДФ. Постепенно, на фоне продолжающегося небольшого падения уровня АТФ (10-15%) начинает увеличиваться внутриклеточный уровень АМФ. Регуляторная роль отношения АТФ/АДФ постепенно ослабевает и сменяется контролем синтеза АТФ через отношение АТР/АМФ. На третьей стадии биоэнергетической гипоксии, когда наблюдается линейное снижение содержания АТФ, контролирующая роль отношений АТФ/АДФ и АТФ/АМФ становится минимальной и происходит снижение суммы адениннуклеотидов и значений энергетического заряда.

Таким образом, в ответ на нарушение оксигенации происходит регуляторная перестройка работы субстратного участка дыхательной цепи. Активация альтернативных метаболических потоков, выполняющих функцию срочных компенсаторных механизмов, позволяет сохранить поступление восстановительных эквивалентов на цитохромный участок дыхательной цепи, благодаря чему функция МФК III и IV и синтез АТФ в этом участке не нарушаются. Это обеспечивает сохранение энергосинтезирующей функции.

Этот процесс направлен на использование энергетически более эффективного в условиях гипоксии сукцинатоксидазного пути окисления субстратов, благодаря чему предупреждаются или ослабляются нарушения синтеза АТФ и параметров аденилатного пула, а также жизненно важных функций организма, устраняется характерный для гипоксии ацидоз, и, как следствие, увеличивается резистентность организма к дефициту кислорода.

Если такое переключение не происходит, то наблюдается резкая дезэнергизация (снижение мембранного потенциала, потеря АТФ и изменения в пуле адениннуклеотидов, нарушение дыхания, связанного с окислением НАД-зависимых субстратов – донаторов электронов для МФК I (Дудченко, Лукьянова, 2003, 2004; Дудченко др., 1996; Лукьянова, 1982, 1989, 1997; Lukyanova, 1988, 1997, 2014; Lukyanova et al., 2008, 2009)).

Все это в совокупности предшествует изменениям других функционально-метаболических параметров, контролирующей жизнедеятельность клетки: конденсации митохондриального матрикса, нарушению кальциевого и калиевого гомеостаза, потере чувствительности к кислороду, нарушению экспрессии митохондриального генома, появлению активных форм кислорода митохондриального происхождения, потере CoQ, инициации выхода цит c в межмембранное пространство, апоптозу, снижению способности клетки адаптироваться к низким pO_2 . При этом происходит повышение отношения лактат/пируват, изменяется редокс-потенциал клетки, развивается метаболический ацидоз. Наряду с этим страдают различные энергозависимые процессы (например, электрогенная функция электровозбудимых клеток, анаболические процессы – синтез мочевины, реакции второй стадии биотрансформации и др.).

Таким образом, **митохондриальная дыхательная цепь дифференцирует тяжесть гипоксического воздействия и в зависимости от его силы формирует при этом качественно различные срочные адаптивные реакции.**

ЦХО не является лимитирующим участком процесса в широком диапазоне pO_2 , вплоть до аноксической области, что обусловлено ее кинетическими свойствами (высоким сродством к кислороду, т.е. низкими значениями

Км(O₂). Описываемое рядом авторов снижение ее активности при сравнительно высоких значениях содержания кислорода в среде может быть связано с ограничением в этих условиях поступления электронов от субстратного участка дыхательной цепи.

3.5.1 Срочная реакция МФК I на гипоксию

Первым, кто обратил внимание на ограничение НАД-зависимого окисления при гипоксии в семидесятые годы прошлого века, был, по-видимому, La Mela. Это явление показалось ему настолько необычным, что на протяжении почти 20 лет он занимался проверкой полученных фактов, однако, многократно подтвердив их, так и не пришел к их пониманию (Mela et al., 1976).

В 1971 г. Ахмеров Р.Н. в лаборатории М.Н. Кондрашовой обнаружил ослабление окисления НАД-зависимых субстратов и альтернативное усиление окисления янтарной кислоты (сукцината) в митохондриях, инкубируемых в среде, где содержание кислорода было резко снижено (до 50 мкМ) (Ахмерови др., 1971).

В 1972 г. Л.Д. Лукьянова, В.Н. Карнаухов и др. (1972) описали явление, названное «*постгипоксической активацией*», которое выражалось в подавлении в срезах мозга после предшествующей кратковременной аноксии НАД-зависимого окисления. Этот эффект усиливался в присутствии ингибитора 1-го ферментного комплекса амитала и был чувствителен к ингибитору 2-го ферментного комплекса – малонату, что говорит об усилении в этот период сукцинатаксидазного окисления (Лукьянова, Дудченко, Чернобаева, 1999; Романова и др., 1991; Чернобаева и др., 1993). Этот вывод был подтвержден на нейрональной модели (Власова и др., 1978; Лукьянова, Власова, 1991а).

В 1973 г. М.Н. Кондрашова (Кондрашова и др., 1973), развивая концепцию компенсаторной перестройки работы дыхательной цепи, связанной с активацией сукцинатаксидазного пути, также отметила высокую ранимость НАД-зависимого участка дыхательной цепи при гипоксии и обусловленную термодинамическими причинами возможность его подавления в условиях дефицита кислорода.

В 1976 г. А.М. Дудченко показал, что при подъеме крыс в барокамере на разные высоты кинетические свойства фермента НАДН-оксидоредуктазы мозга меняются: максимальная скорость фермента вначале увеличивается, а затем при усилении гипоксического воздействия – снижается (Дудченко, 1976).

Фазную зависимость активности митохондриальных ферментов от тяжести и длительности гипоксического воздействия описала Хватова Е.М. (Хватова и др., 1977, 1987). Ею и сотрудниками было обнаружено, что в первые часы гипоксии активность НАДН-дегидрогеназного пути была снижена, а сукцинатдегидрогеназного – повышена. Этими же авторами было доказано, что при острой гипоксии разной длительности изменения НАДН-дегидрогеназной активности трансформировались от положительных сдвигов в отрицательные.

Аналогичные данные были получены А.А. Корнеевым при моделировании на изолированном сокращающемся сердце ишемии разной тяжести (Корнеев, Лукьянова, 1987; Корнеев и др., 1990; Лукьянова, Корнеев и др., 1990 а). Им

было показано, что срочной реакцией миокарда НУ к гипоксии животных на умеренный дефицит кислорода (снижение его концентрации в перфузате на 20%) является восстановление ПНН и ФМН, подтверждающее ограничение потока электронов в НАД-зависимом участке дыхательной цепи, которое коррелировало со снижением клеточного дыхания и содержания АТФ. Еще одним доказательством, свидетельствующим в пользу такого вывода, было наблюдаемое этим же автором в присутствии менадиона (витамина K_3), способного шунтировать перенос электронов от НАДН к CoQ, окисление пиридиннуклеотидов и флавинов, частичное восстановление дыхания и содержания АТФ. Использование сукцината в качестве субстрата окисления резко увеличивало резистентность миокарда к дефициту кислорода. Именно Корнеевым впервые был сформулирован вывод о том, что подавление функции МФК I в ответ на гипоксическое воздействие является одним из обязательных этапов в фазной ответной реакции митохондриальной дыхательной цепи на гипоксию, реализующимся преимущественно в миокарде НУ к гипоксии животных (Корнеев, Лукьянова, 1987; Корнеев и др., 1990, 1990; Лукьянова, Корнеев и др., 1982). Аналогичные данные были получены на КГМ (Чернобаева, 1985).

В зарубежной литературе экспериментальные подтверждения инактивации электрон-транспортной функции МФК I в различных тканях в условиях гипоксии, сохраняющейся в постгипоксический период (первые 30 минут – 2 часа реоксигенации), появились значительно позже (Agani, 2001, 2002; Chavez et al., 1995; Da Silva et al., 2003; Di Lisa, Ziegler, 2001; Feldkamp et al., 2004; Genova et al., 1995; Maklashinas et al., 2002; Pitkänen, Robinson, 1996a; Pitkänen et al., 1996b; Robinson, 1998; Rouslin, Millard, 1980; Weinberg et al., 2000]. Sadek et al., 2004; Weinberg et al., 2000).

Таким образом, признаками инактивации МФК I при гипоксии являются: снижение интенсивности окисления НАД-зависимых субстратов и эффективности зависящего от него ОФ; уменьшение чувствительности дыхания различных тканей к специфическим ингибиторам НАД-зависимого участка дыхательной цепи (амиталу, ротенону и др); увеличение степени восстановления дыхательных переносчиков МФК I (ПНН и ФМН), отражающее подавление переноса восстановительных эквивалентов через этот участок; накопление НАД-зависимых субстратов цикла Кребса при сохранении активности остальных ферментов дыхательной цепи (Лукьянова, 1997, 2004; Лукьянова, 2011; Хватова и др., 1977, 1987). Вещества, шунтирующие перенос электронов на участке НАДН-CoQ (различные хиноны), способны восстанавливать дыхание и редокс-состояние дыхательных переносчиков, что свидетельствует о неповрежденности цитохромного участка в этот период.

3.5.2 Срочная реакция МФК II на гипоксию

В гипоксических условиях, когда увеличивается степень восстановления внутриклеточного НАДН и происходит подавление электрон-транспортной функции МФК I, наблюдается активация МФК II.

В 1966 г Гольдберг и сотрудники обнаружили, что уже через 30 секунд после полной ишемии мозга на фоне снижения концентрации ряда НАД-за-

висимых субстратов содержание сукцината в ткани мозга достоверно увеличивалось (Goldberg, Janet, 1966). Позже аналогичные данные были получены и в других работах (Хочачка, Сомеро, 1988; Hohl et al., 1987; Taegtmeyer 1998; Nochachka et al., 1996). Содержание сукцината в тканях и крови при этом могло увеличиваться на порядок и более (до 4-7 мМ), что позволило считать его *маркерной молекулой гипоксии* (Hems, Brosnan, 1970).

Параллельно этому при гипоксии наблюдается увеличение активности сукцинатдегидрогеназы (Ахмеров и др., 1971; Кондрашова, 1971, 1972, 1976; Кондрашова, Маевский, 1978; Кондрашова и др., 1973, 1974, 1996; Лукьянова, 1975а, б, 1997, 2004а, 2011; Маевский и др., 2000, 2000а; Aithal, Ramasarma, 1968, 1969; **Correa et al., 2007**; Goldberg, Janet, 1966; Hohl et al., 1987; Kondrashova, 1993; Lukyanova, Kirova, 2015; Paddenberget al., 2003; Sivaramakrishnan, Ramasarma, 1973, 1975; Susheela, Ramasarma, 1973; Weinberg et al, 2000).

Меняются и кинетические свойства основных ферментных комплексов МФК I и МФК II. Так в КГМ НУ крыс любое гипоксическое воздействие приводит к противоположным изменениям Км обоих ферментов комплексов: увеличению значений Км НАДН-убихинон-оксидоредуктазы (МФК I) и уменьшению значений Км сукцинатдегидрогеназы (МФК II) (Дудченко, Лукьянова, 2004; Лукьянова, 2004а; Лукьянова, 2008, 2011; Лукьянова и др., 2007; Lukyanova, 2013, 2014; Lukyanova et al., 2010). Процесс отражает снижение эффективности работы фермента в первом случае и его увеличение – во втором.

Активация в этих условиях сукцинатоксидазного окисления предупреждает или ослабляет нарушения синтеза АТФ и оказывает нормирующее действие на параметры аденилатного пула, а также на жизненно важные функции организма, способствует стабилизации и нормализации рН и устранению характерного для гипоксии ацидоза (Маевский и др., 2001а), увеличивает резистентность организма к дефициту кислорода (Лукьянова, 2004а; Lukyanova, 2013, 2014; Weinberg et al, 2000).

Возможность регуляторного переключения при гипоксии метаболических путей от окисления НАД-зависимых субстратов на окисление сукцината обусловлена следующими причинами: 1) чувствительностью сукцинатдегидрогеназы (СДГ – МФК II) к редокс-состоянию ПНН, железо-серных центров комплекса I и коэнзима Q, ее способностью активироваться при росте степени их восстановленности и тормозиться при их окислении; 2) ограничению щавелевоуксусного торможения, подавляющего сукцинат-зависимое дыхание, так как в условиях высокой восстановленности дыхательной цепи оксалоацетат – конкурентный ингибитор СДГ, окисляется в малат и его ингибирующее действие на фермент уменьшается; 3) кинетическими преимуществами окисления сукцината – ФАД-зависимого субстрата – в условиях высокой восстановленности НАДН (гипоксия) перед НАД-зависимыми субстратами благодаря тому, что флавины в этих условиях сохраняются в более окисленном состоянии; 4) способностью сукцинат-зависимого окисления поддерживать высокую скорость доставки восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь и обеспечивать таким образом наибольший выход богатых энергией соединений в единицу времени, что для биологической системы важнее, чем высокий коэффициент полезного действия, оцениваемый числом пунктов фосфорилирования,

которое в данном случае уменьшается (Кондрашова, Маевский, 1978; Кондрашова и др., 1996; Маевский, 2000; Маевский и др., 1996, 2000).

Переключение метаболических путей окисления митохондриальных субстратов при разных формах гипоксии является регуляторным и компенсаторным механизмом, обязательным для формирования *срочных реакций адаптации*, который реализуется в условиях умеренного дефицита кислорода и усиления гликолиза в большинстве тканей (мозг, миокард, печень, почки, лимфоциты). Если оно не происходит, то некомпенсированная дисфункция МФК I при гипоксии сопровождается снижением мембранного потенциала, потерей АТФ и изменениями в пуле адениннуклеотидов, нарушением дыхания, связанного с окислением НАД-зависимых субстратов – донаторов электронов для МФК I, конденсацией митохондриального матрикса (Лукьянова, 1997, 2004б, 2008, 2011; Лукьянова, Клейменова и др., 2001; Lukyanova, 2002, 2004, 2013, 2014; Weinberg et al, 2000).

Все это в совокупности предшествует изменениям других функционально-метаболических параметров, контролирующих жизнедеятельность клетки. При этом первыми страдают различные энергозависимые процессы (например, электрогенная функция электровозбудимых клеток, анаболические процессы – синтез мочевины, реакции 2-й стадии биотрансформации и др.) (Дудченко Белоусова и др., 1992; Власова и др., 1978; Дудченко, 2003; Дудченко, Лукьянова, 2004; Лукьянова, Клейменова и др., 2001).

Генерация АТФ в митохондриях, сопряженная с компенсаторным усилением сукцинатоксидазного окисления, задерживает эти процессы (Лукьянова, 1997, 2000, 2001, 2004а, 2009; Taegmeyer 1998; Weinberg et al, 2000).

В зависимости от тканево-специфических особенностей метаболизма, пути образования эндогенного сукцината при гипоксии различны. Однако в их основе лежат аспартат- и глутамат-зависимые аминокислот-трансферазные реакции, субстратное фосфорилирование α -кетоглутурата и α -глицерофосфата, обращение цикла Кребса и реакций окислительного декарбоксилирования (Кондрашова, 1989, 1991; Casciarano et al., 1976; Goldberg, Janet, 1966; Hochachka et al., 1996; Hohlet et al., 1987; MacKenzie et al., 2007; McDonald, 2002; Napolitano et al., 2004; Sanborn et al., 1979; Taegmeyer, 1998; Weinberg et al., 2000).

3.5.3 Особенности срочной динамики содержания митохондриальных ферментов при гипоксии

Прямые доказательства способности митохондриальных ферментов модулировать их активность в условиях гипоксии с целью вовлечения наиболее эффективных путей синтеза энергии были получены благодаря техническому прогрессу и методическим инновациям последних десятилетий в области клеточной и молекулярной биологии. Все это позволило нам впервые провести комплексную оценку срочной реакции некоторых субъединиц митохондриальных ферментных комплексов дыхательной цепи (по изменению их содержания), участвующих в транспорте электронов, в ответ на разные режимы гипоксических воздействий.

Благодаря этому удалось не только подтвердить способность митохондриальных ферментов модулировать их активность в условиях гипоксии с целью вовлечения наиболее эффективных путей синтеза энергии, но и показать, что характер этого модулирования зависит от тяжести гипоксического воздействия (Лукьянова и др., 2018).

Так при *слабом* (пороговом) гипоксическом воздействии (14% O₂ относительно атмосферного; содержание O₂ во вдыхаемом воздухе снижено на 33%) уровень исследуемых ферментов на субстратном участке дыхательной цепи (субъединиц NDUFV2 – МФК I и SDHA – МФК II) лишь недостоверно снижался в первые 15-30 минут. Однако изменений активности СДГ и содержания сукцината не наблюдалось. При этом одновременно происходило увеличение содержания субъединиц ферментов цитохромного участка дыхательной цепи (Cyt b – МФК III и COX1- МФК IV), достигающее максимальных значений через 45-60 минут воздействия (рис. 13, А, Б). Уровень АТФ5А (АТФ-аза) не менялся. Все это указывает на активацию электрон-транспортной функции цитохромного участка дыхательной цепи при сохранении активности АТФ-азы на уровне нормы. Следовательно, усиление электрон-транспортной функции цитохромного участка дыхательной цепи в КГМ крыс в этом случае могло быть отражением активации окислительного процесса за счет увеличения активности МФК I, сопряженного с окислением НАД-зависимых субстратов.

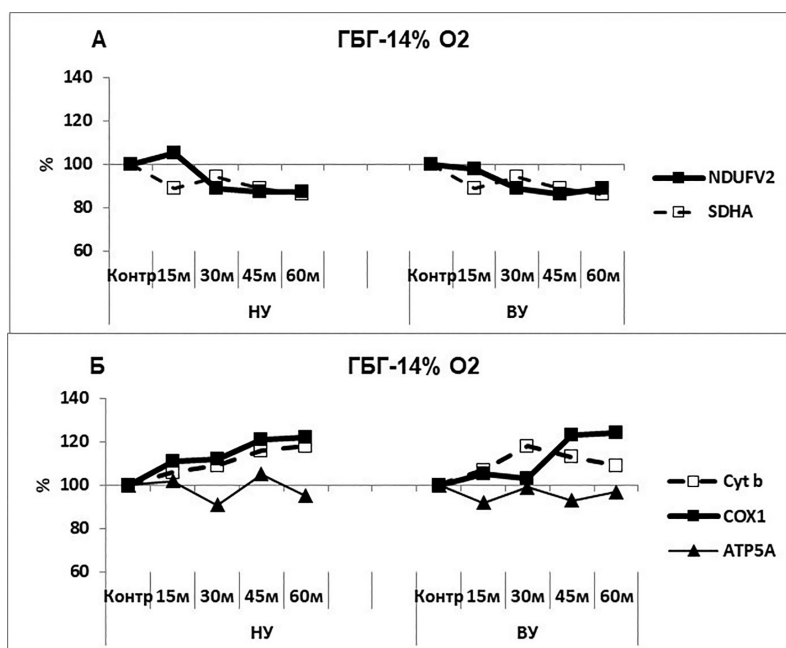


Рисунок 13 – Влияние слабой гипобарической гипоксии (ГБГ-14% O₂) на содержание исследуемых субъединиц ферментов митохондриальных комплексов:

А – NDUFV2 (МФК I) и SDHA (МФК II);

Б – Cyt b (МФК-III); COX1 (МФК IV) и АТФ5А (МФК V) в коре головного мозга низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) крыс:

15м, 30м, 45м, 60м– продолжительность воздействия ГБГ в минутах

Одновременно данное гипоксическое воздействие приводило к увеличению количества мелких митохондрий, повышению плотности матрикса, увеличению, по сравнению с нормоксией, органелл с плотноупакованными кристами, что отражает увеличение их метаболической активности и усиление ОФ (Павлик и др., 2017).

При этом толерантность животных, оцениваемая по их способности переносить воздействие острой гипоксии, увеличивалась, так же как и экспрессия транскрипционного фактора HIF-1 α в КГМ обоих типов животных (Кирова и др., 2012), что говорит о формировании в этих условиях срочных адаптивных реакций.

Наблюдаемые изменения не были связаны с активацией свободнорадикальных процессов, так как каких-либо изменений в их интенсивности при данном гипоксическом режиме не наблюдалось (Кирова, 2015; Лукьянова, Кирова, 2011). Более того, в КГМ обоих типов крыс в этих условиях сохранялась способность системы глутатиона к ответной реакции, характерной для физиологической нормы, что говорит о сбалансированности ее работы и способности контролировать окислительно-восстановительный гомеостаз клеток (Кирова, 2015).

Таким образом, данный режим гипоксии можно рассматривать как *пороговое воздействие, активирующее физиологические резервы митохондриальной дыхательной цепи без привлечения других компенсаторных механизмов.*

В отличие от этого в условиях гипоксии *средней тяжести* (10,5% O₂, снижение содержания O₂ во вдыхаемом воздухе на 50%) наблюдалось *одновременное снижение* содержания субъединицы NDUFV2 (МФК I), выявляемое уже через 15 минут и максимально усиливающееся через 60 минут, и *увеличение* экспрессии субъединицы SDHA (МФК II) (рис. 14, А), активности СДГ и содержания сукцината. Все в целом отражает ингибирование НАД-зависимого окисления и активацию сукцинатоксидазного окисления, показанные нами ранее. При этом электрон-транспортная функция цитохромного участка дыхательной цепи сохраняет высокую активность, что подтверждается достоверным увеличением экспрессии субъединиц Cyt *b* (МФК III) и COX1 (МФК IV) (рис. 14, Б). Содержание, однако, субъединицы ATP5A (АТФ-аза) не только не увеличивалось, но несколько снижалось, что может быть связано с уменьшением поступающего к ней потока протонов в условиях окисления сукцината.

Таким образом, эти данные подтверждают наше более раннее заключение: в *определенном диапазоне сниженных концентраций кислорода происходит компенсаторно-регуляторная смена метаболических путей окисления энергетических субстратов в дыхательной цепи: НАД-зависимого на сукцинатоксидазный (репрограммирование работы дыхательной цепи).*

Выше было показано (п. 3. 3), что именно в этот период происходят максимально выраженные ультраструктурные изменения в митохондриях КГМ, отражающие срочное адаптивное усиление их функциональной активности, более выраженные у НУ животных (Павлик и др., 2017). Срочная экспрессия сукцинатзависимого гипоксического фактора HIF-1 α в КГМ также достигала в этих условиях своего максимума (Кирова и др., 2012), как и усиление степени выраженности срочной толерантности животных (в 5,5

и 8,5 раз у ВУ и НУ соответственно). Таким образом, способность к формированию срочных адаптивных защитных механизмов при репрограммировании работы дыхательной цепи на сукцинатоксидазный путь окисления не только сохранялась, но и была усилена.

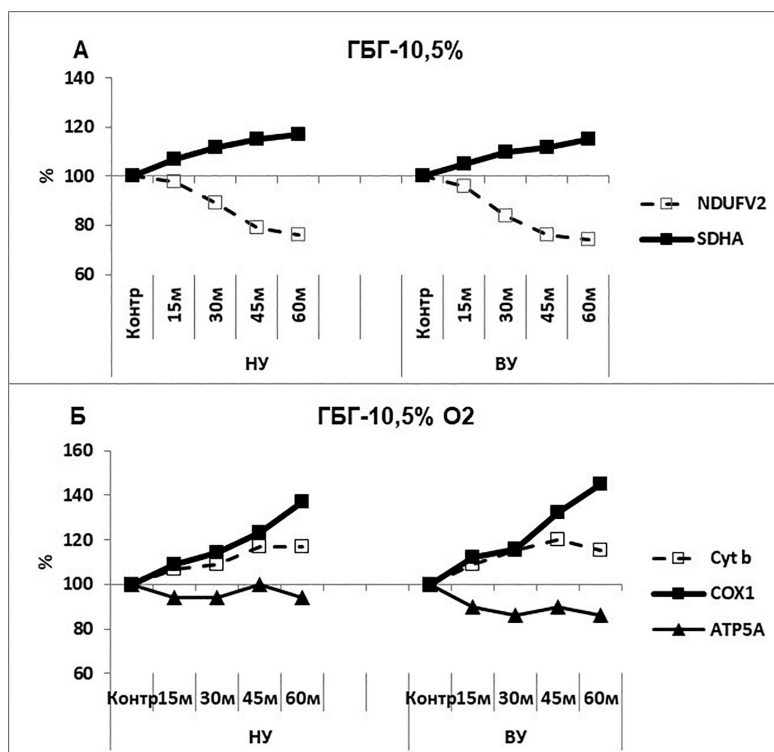


Рисунок 14 – Влияние гипобарической гипоксии средней тяжести (ГБГ-10,5% O₂) на содержание исследуемых субъединиц ферментов митохондриальных комплексов
А – NDUFV2 (МФК I) и SDHA (МФК II);
Б – Cyt b (МФК-III); COX1 (МФК IV) и ATP5A (МФК V) в коре головного мозга низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) крыс. 15м, 30м, 45м, 60м – продолжительность воздействия ГБГ в минутах

Еще один тип реакции ферментов дыхательной цепи на гипоксическое воздействие формировался в условиях *тяжелой* гипоксии (8% O₂, снижение содержания O₂ во вдыхаемом воздухе на 62%). В этом случае уже в первые 30-45 минут наблюдалась одновременная срочная экспрессия не только субъединицы SDHA (МФК II), но и NDUFV2 (МФК I), более выраженная в КГМ НУ (рис. 15), протекающая тем не менее на фоне *снижения активности СДГ* как относительно предыдущего случая, так и нормоксии и сопровождаемая *окислением ПНН*.

Таким образом, роль сукцината как субстрата дыхательной цепи в этот период, видимо, снижается, однако при этом происходит восстановление активности МФК I. При этом сохранялось повышенное содержание цит *с* и COX, а уровень ATP5A (АТФ-азы) даже увеличивался сравнительно с предыдущими случаями.

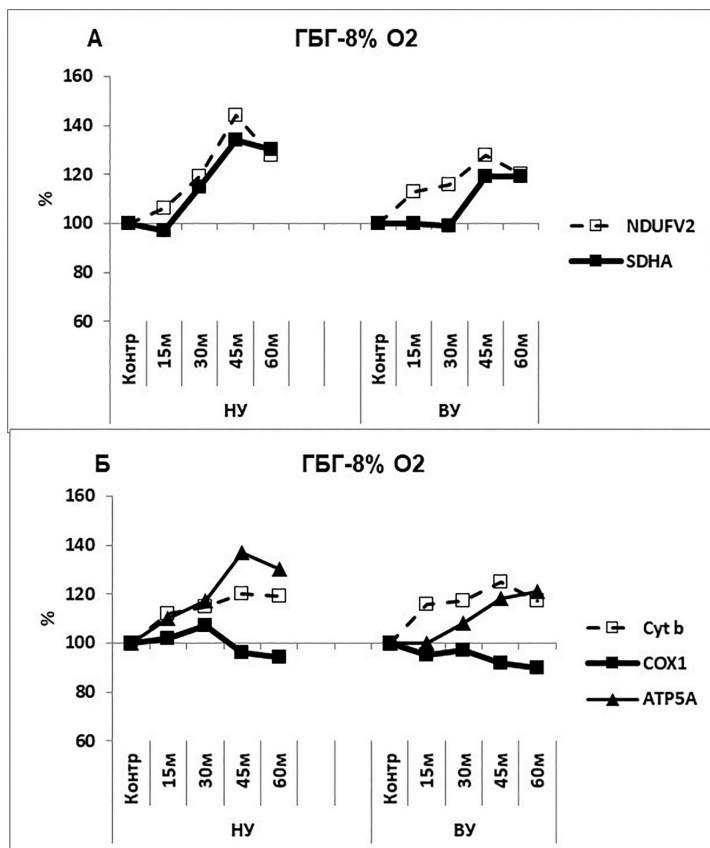


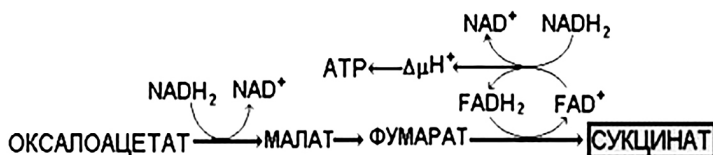
Рисунок.15 – Влияние тяжелой гипобарической гипоксии (ГБГ-8% O₂) на содержание исследуемых субъединиц ферментов митохондриальных комплексов
А – NDUFV2 (МФК I) и SDHA (МФК II);
Б – Cyt b (МФК-III); COX1 (МФК IV) и ATP5A (МФК V) в коре головного мозга низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) крыс
 15м, 30м, 45м, 60м– продолжительность воздействия ГБГ в минутах

Как уже отмечалось выше при этом гипоксическом режиме появлялись признаки повреждения ультраструктуры митохондрий КГМ, более выраженные у НУ животных и свидетельствующие о функциональном перенапряжении работ дыхательной цепи; происходила активация окислительных процессов (увеличение содержания окисленного глутатиона, гидроперексидов и диеновых конъюгатов), что указывает на развитие окислительного стресса; резко снижались экспрессия гипоксического транскрипционного фактора HIF-1α в КГМ. Все в целом говорит о том, что, несмотря на сохранение энергетической функции в этих условиях, появляются признаки декомпенсации в работе дыхательной цепи.

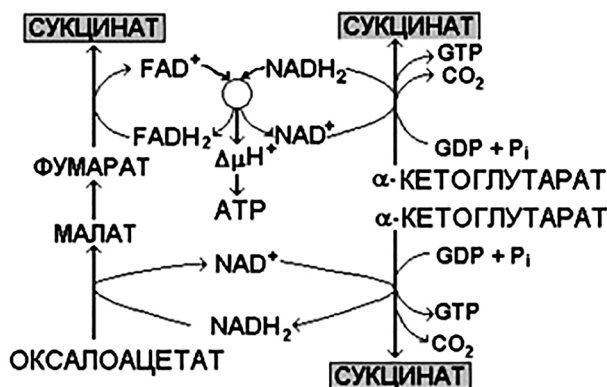
Особенностью этого периода является **восстановление электрон-транспортной функции МФК I**, что возможно лишь при снижении степени восстановленности НАДН на субстратном участке дыхательной цепи.

Известно несколько вариантов путей окисления НАДН в условиях очень низких значений концентрации O_2 в среде (Маевский, 2000; Маевский, Гришина и др., 1996, 2000, 2001. 2017; Hochachka, Dressendorfer, 1976; Seiler, Wagner, 1976; Taegtmeyer, 1978):

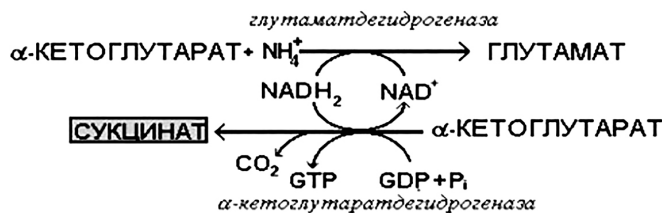
А) Восстановительное обращение цикла Кребса (от оксалоацетата до сукцината), которое, как известно, происходит в полуанаэробных условиях и сопряжено с окислительными превращениями промежуточных субстратов цикла Кребса (Маевский, 2000; Маевский, Гришина и др., 1996, 2000).



Б) Сопряженное течение восстановительного обращения и окислительных реакций ЦТК (Маевский, 2000; Маевский, Гришина и др., 1996, 2000).

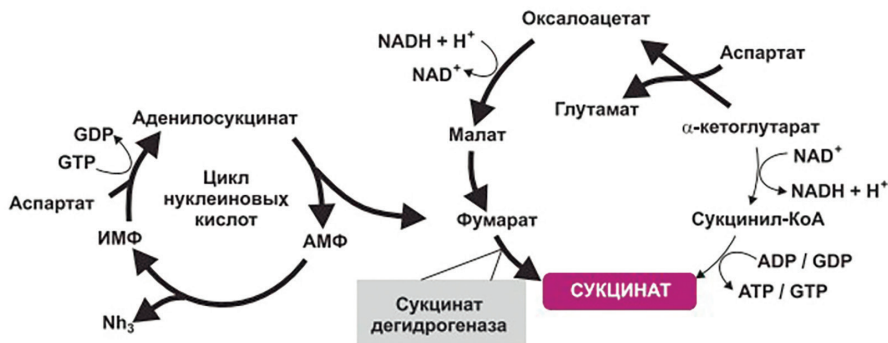


В) Анаэробная дисмутация α -кетоглутарата в присутствии аммония по Кребсу-Коэнзу, когда одна молекула α -кетоглутарата используется для восстановительного аминирования в глутамат с одновременным окислением восстановленных ПНН, что поддерживает окисление другой молекулы α -кетоглутарата до сукцината (Маевский, Гришина. 2017):



Для ишемических состояний доказана возможность вовлечения еще одного метаболического пути продукции сукцината и сохранения сукцинатаоксидазного пути окисления (МФК II) при восстановительном обращении цикла Кребса за счет активации цикла пуриновых нуклеотидов и малат-аспарат-

ного шунта с образованием фумарата, восстанавливающегося в сукцинат. В результате происходит снижение степени восстановленности NADH и восстановление активности МФК I, коррелирующее с резким увеличением содержания АТА-синтазы (Фонсека и др., 2017; Chouchani et al., 2014).



Каждая из этих реакций в преданоксических состояниях способствует сукцинатзависимому восстановлению «физиологического» баланса между окисленным и восстановленным НАД, и электрон-транспортной функцией на субстратном (МФК I) участке дыхательной цепи. Благодаря этому в условиях *тяжелых* гипоксических воздействий поставщиками электронов являются как НАД-зависимое, так и сукцинатоксидазное окисление.

Таким образом, в условиях *in vivo* митохондрии КГМ отвечают на градуальные изменения в содержании кислорода в окружающем воздухе характерными срочными градуальными изменениями состояния митохондриальных ферментов, более выраженными у НУ крыс и отражающими смену метаболических путей окисления энергетических субстратов и изменения эффективности работы дыхательной цепи, влияющих на степень энергизации клетки.

Первые признаки реакции митохондрий КГМ на дефицит O_2 появляются при его снижении на 30-33% относительно содержания в воздухе. В этих условиях активация работы дыхательной цепи в ответ на гипоксическое воздействие происходит за счет физиологических резервов организма, т.е. усиления характерного для КГМ НАД-зависимого окисления.

При снижении концентрации O_2 во вдыхаемом воздухе на 50% происходит компенсаторное вовлечение эндогенного сукцината в окислительный метаболизм в качестве главного митохондриального субстрата (репрограммирование работы дыхательной цепи за счет активации МФК II при сопряженном подавлении электрон-транспортной функции МФК I). Этот процесс позволяет сохранить синтез энергии на уровне, необходимом для полноценного поддержания внутриклеточных энергозависимых процессов в условиях высокой восстановленности ПНН, и оптимизирует формирование срочных сукцинатзависимых сигнальных механизмов адаптации.

При снижении концентрации кислорода на 60-63% и менее роль сукцинатоксидазного окисления в качестве энергетического субстрата снижается. Однако при этом активируются ряд шунтов окисления, сопряженных с эндогенным образованием сукцината, которые способствуют уменьше-

нию степени восстановленности ПНН и восстановлению работы МФК I. Тем не менее, это состояние отражает, видимо, перенапряжение системы (*начальная стадия декомпенсации энергетического обмена*) и сопряжено с появлением нарушений ультраструктуры митохондрий, а также снижением экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 α . Ранее нами было показано, что антигипоксическое действие сукцината, действительно, ограничено при очень низком содержании кислорода (Малышев и др., 1996).

Таким образом, ***митохондриальная дыхательная цепь и ее ферменты являются сенсорами кислорода и играют роль таргетной мишени при формировании приспособительных реакций организма как на ранней стадии гипоксического воздействия, так и в более поздний период.***

3.6 Митохондриальная «дисфункция» – типовой патологический процесс

В настоящее время имеется огромное количество доказательств, что митохондриальная дисфункция является обязательной составляющей любой патологии и может рассматриваться как *типовой патологический процесс*.

Клиническим проявлением дисрегуляции энергетического обмена в условиях ограничения снабжения клетки кислородом и возникновения биоэнергетических нарушений являются инсульты, инфаркты, ишемическая болезнь (Гусев, Скворцова, 20016; Хазанов и др., 1989; Briere et al., 2004; Devin, Rigoulet, 2007; Gellerich, 2009; Gnaiger, 2005; Gnaiger et al, 2000; King et al., 2006; Kunz et al., 2000; Michiels, 2004; Napolitano et al., 2004; Petrozzi et al, 2007; Saks et al., 2006). В мире ежегодно переносят церебральный инсульт около 6 млн человек и умирают от него около 4,7 млн человек. В большинстве стран инсульт занимает 2-3-е место в структуре общей смертности населения. Он же является основной причиной инвалидизации населения. К этой статистике следует добавить заболевания сердечно-сосудистой и дыхательной систем, приводящие к инфарктам различных органов (сердца, печени, почки), заболевания крови и связанные с этим последствия (например, анемии).

Митохондриальная патология включается как обязательный элемент в апоптоз и некроз, сопутствует воспалительным процессам. Она имеет место при алкогольной интоксикации, при старении, при травматическом шоке, эндотоксикозах, инфекционных заболеваниях, нейропсихических заболеваниях, кардиомиопатиях, сахарном диабете I типа, моногенных заболеваниях соединительной ткани, туберозном склерозе, наследственных формах неэндокринной низкорослости, нефропатиях, гипербилирубинемии у новорожденных, у детей, рожденных с малой массой веса (Сухоруков, 2011).

Список заболеваний, сопровождающихся митохондриальной недостаточностью, непрерывно расширяется, что определяет исключительную медицинскую и социальную значимость этого явления, так же как и проблемы кислородной недостаточности в целом. В связи с этим уместно вспомнить слова В.П. Скулачева о том, что « в литературе есть достаточно много сообщений о патологиях, сопровождающихся тем или иным нарушением в системе окислительного фосфорилирования. По-видимому, таких сообщений

было бы гораздо больше, если бы врачи располагали простыми методами диагностики подобных нарушений» (Скулачев, 1989). Тот факт, что митохондриальная дисфункция является далеко не только результатом нарушения кровоснабжения и доставки кислорода к клетке, но в огромном числе случаев этот процесс первичен, становится все более очевидным. Именно это позволяет рассматривать его как *типовой патологический процесс*.

Напомним, что под патологическим процессом понимают «закономерную последовательность явлений, включающую защитно-приспособительные реакции и нарушения жизнедеятельности в разных сочетаниях, развивающихся под действием патогенного фактора» (Лосев, 1995). Патологические процессы – это частное по отношению к болезни понятие. Один и тот же типовой патологический процесс может присутствовать при многих разных болезнях. И наоборот, «болезнь представляет собой множество разнообразных типовых патологических процессов на разных структурно-функциональных уровнях» (Крыжановский, 2002).

Типовые патологические процессы не обладают этиологической и нозологической спецификой. Однако специфический патогенез различных форм патологии формируется из неспецифических типовых патологических процессов.

Признаками патологического процесса являются стереотипность, универсальность, многопричинность (полиэтиологизм), аутохтонность (способность к запрограммированному саморазвитию), генетическая запрограммированность. Типовой патологический процесс – продукт эволюционного развития организма. Все эти признаки характерны для процесса развития митохондриальных дисфункций при гипоксии и других патологиях.

Действительно, тканевая или биоэнергетическая гипоксия обладает **стереотипностью**, т.е. типическими запрограммированными чертами, какова бы ни была ее этиология. Во всех случаях – это фазно развивающееся репрограммирование работы митохондриальных ферментов, приводящее к дисрегуляции электрон-транспортной и сопрягающей функции митохондрий и тем самым – к энергодифициту.

Универсальность тканевой (биоэнергетической) гипоксии подтверждается тем, что она встречается в структуре различных нозологических единиц, при любой патологии, сопровождающейся не только нарушениями функции дыхательной, сердечно-сосудистой и кислородтранспортной систем, но и при действии токсических веществ эндогенной и экзогенной природы.

Смерть организма – крайнее выражение этого процесса, вызванное стойким прекращением спонтанного кровообращения и дыхания. Следовательно, в конце любой смертельной болезни, независимо от ее причин, наступает острая тканевая (биоэнергетическая) гипоксия, обусловленная полным подавлением энергосинтезирующей функции дыхательной цепи.

Некроз, заканчивающийся гибелью клетки, также включает в своем патогенезе в качестве одного из обязательных звеньев биоэнергетическую гипоксию.

Многопричинность (полиэтиологизм) тканевой (биоэнергетической) гипоксии выражается в том, что она может запускаться самыми различными факторами, имеющими часто противоположное действие: гипоксигенацией, гипероксигенацией, токсическими продуктами эндогенного и экзогенного происхождения, стрессовыми воздействиями, циркуляторными нарушениями и пр.

Аутохтонность тканевой (биоэнергетической) гипоксии, т.е. способность процесса на определенной стадии саморазвиваться через запрограммированные этапы при участии каскадного принципа и механизмов самоограничения до естественного энергетически оправданного конца – проявляется в фазном характере биоэнергетической гипоксии, последовательно включающей компенсаторные реакции (активация сукцинатоксидазного окисления). В определенных условиях биоэнергетическая гипоксия может становиться неаутохтонным процессом, когда при постоянном действии причинного фактора происходит его кумуляция, определяющая, детерминирующая необратимость процесса (некомпенсируемая стадия биоэнергетической гипоксии).

Эквифинальность тканевой гипоксии выражается в едином конечном результате процесса – возникновении энергодефицита, независимо от пусковой причины.

Из всего вышесказанного об особенностях развития митохондриальных дисфункций при гипоксии у высоко- и низкоустойчивых к гипоксии животных, следует, что процесс генетически запрограммирован и эволюционно закреплен.

Таким образом, динамика биоэнергетических изменений при гипоксии характерна для типового патологического процесса и является **базисным биоэнергетическим** механизмом любых форм гипоксии, включаясь в них как обязательный составляющий элемент (рис. 16).

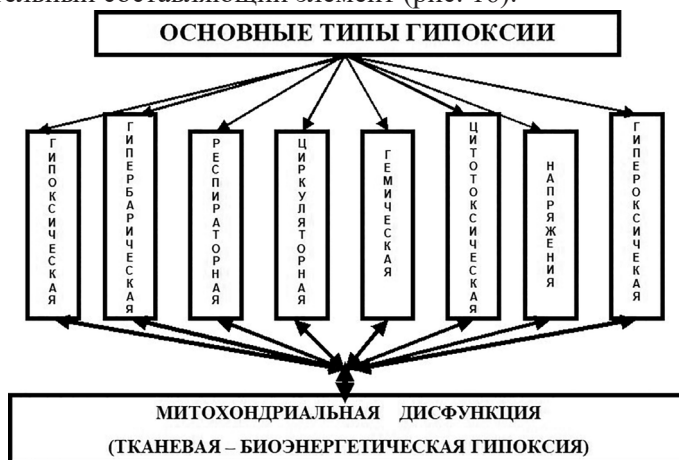


Рисунок 16. Биоэнергетическая гипоксия – базисный молекулярный механизм различных типов системных гипоксий.

Следует отметить, что понимание того, что первопричиной характерных для гипоксии нарушений, их молекулярной основой являются нарушения энергетического обмена, пришло и к патофизиологам. В учебнике по патофизиологии, вышедшей под редакцией П.Ф. Литвицкого (2002), дается следующая формулировка гипоксии: «Гипоксия – типовой патологический процесс, развивающийся в результате недостаточности биологического окисления, приводящий к нарушению энергетического обеспечения функций и пластических процессов в организме».

Нарушение функции митохондрий неизбежно ведет к различным патологиям и даже к смерти. При различных системных патологиях митохондрии первыми подвергаются изменениям: происходит конденсация и их набухание, в матриксе появляются митохондриальные включения, что может указывать на функциональное напряжение и кислородное голодание клетки. Все это ведет к тяжелой деструкции митохондрий и гибели клетки (Струков, Серов, 1995 Сухоруков, 2011). Внутреннее пространство митохондрий уплотняется, происходит деформация крист и потеря митохондриальных гранул, гомогенизация матрикса и появление в нем хлопьевидного материала, очагов обызвествления, происходят разрывы наружной мембраны митохондрий.

В настоящее время установлено, что помимо фенотипических, существуют генетически обусловленные дефекты митохондриальных ферментов, являющиеся причиной многих врожденных полисистемных заболеваний (Сухоруков, 2011). Они получили название митохондриальных болезней. Основными проявлениями таких болезней являются признаки поражения нервной, мышечной систем и сердца, наличие эндокринных расстройств, притупление зрения и слуха.

Многие заболевания являются результатом мутаций в белках, которые модулируют митохондриальное поведение. Мутации в Mfn2 приводят к болезни Charcot-Marie Tooth Type 2A, характеризующейся потерей периферических моторных нейронов (Züchner, 2004), а мутации в Opa1 и Mfn2 отвечают за аутосомно-доминантную оптическую атрофию, вызывая прогрессирующую слепоту (Alexander et al., 2000; , Delettre, et al., 2000; Loson et al., 2013; Song et al., 2009).

Во всех случаях имеет место нарушение энергосинтезирующей функции мышечной ткани, сопровождающееся морфологическими изменениями («красные мышцы»), подавлением сократительной способности и функции других органов, прежде всего наиболее энергозависимых. Во всех случаях такие наследственные патологии являются причиной нарастающей с возрастом дисрегуляции энергетического обмена, приводящей в конечном счете к летальному исходу.

Таким образом, можно говорить о появлении еще одного нового раздела биологии – **«митохондриальной патофизиологии» (mitochondria pathophysiology).**

Глава IV РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ФОРМИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ

Адаптация к гипоксии — это эволюционно сформировавшаяся комплексная реакция организма, протекающая как на системном, так и на клеточном уровнях и направленная на индукцию механизмов, способствующих сохранению в условиях дефицита кислорода синтеза энергии, необходимой для поддержания энергозависимых процессов. Адаптационные реакции по существу своему являются реакциями, предупреждающими повреждение организма. Благодаря им при взаимодействии организма и среды достигается оптимальное функционирование и сбалансированность всех систем организма. Особенностью адаптации к гипоксии является тот факт, что главный фактор этого процесса — кислород — включается в метаболизм аэробных организмов и активно потребляется ими в качестве жизненно необходимого субстрата. При этом происходит мобилизация регуляторных центров дыхательной, сердечно-сосудистой систем, транспорта кислорода, а также внутриклеточных механизмов, связанных с синтезом энергии.

Различают две стадии формирования механизмов адаптации: 1) *фазу срочной адаптации*; 2) *фазу формирования реакций долгосрочной адаптации*.

4.1 Роль митохондрий в формировании биоэнергетических механизмов срочной адаптации к гипоксии

Эволюционно сложилось так, что реакция организма на любое новое и достаточно сильное воздействие среды (на любое нарушение гомеостаза) формируется сразу после начала действия раздражителя системой, *специфически* реагирующей на него (в данном случае — митохондриальной дыхательной цепью) на базе *уже существующих, ранее сформировавшихся физиологических механизмов и программ*. Под *физиологическими резервами организма* понимается выработанная в процессе эволюции адаптационная и компенсаторная способность органа, системы и организма в целом срочно усиливать во много раз в ответ на стрессовый раздражитель (гипоксия) интенсивность своей деятельности по сравнению с состоянием относительного покоя (Бресткин, 1968).

Фаза срочной адаптации к гипоксии — это генерализованный одномоментный ответ на гипоксическое воздействие, включающий как неспецифическую стресс-реакцию (активацию адренергической и гипофизарно-адреналовой систем — стресс-синдром или «общий адаптационный синдром» по Селье (Selye Н., 1952), так и мобилизацию специфических для гипоксии срочных компенсаторных реакций, которые сопровождаются экспрессией мРНК, специфических белков и генов в ответ на саму гипоксию, что в целом обеспечивает формирование срочной защитной реакции организма от гипоксического воздействия.

Причиной активации механизмов срочной адаптации организма к гипоксии является снижение эффективности биологического окисления в условиях дефицита кислорода и, как следствие, снижение содержания в тканях АТФ, необходимого для обеспечения оптимального уровня жизнедеятельности.

В зависимости от силы первичного воздействия в этот период активируются также множественные соподчиненные сигнальные системы. Происходит выброс аденозина, NO, опиоидов, брадикинина, транскрипционного гипоксического фактора HIF-1 α и других интермедиатов, которые связываются с рецепторами, сопряженными с G-белками, и инициируют сигнальные пути, контролируемые различными киназами: фосфатидил-инозитол-3-киназой (PI3K), протенкиназой C (PKC), митоген-активируемой киназой (МАРК) и др. Все они выполняют адаптивно-регуляторную роль и опосредуют клеточный рост, гипертрофию, пролиферацию, миграцию, выживаемость и клеточную смерть, т.е. участвуют в формировании отсроченных геном-зависимых защитных эффектов *долгосрочной адаптации* (Меерсон, 1993, 2009; Лукьянова, 1989, 1997, 2004; Самойлов, 1985, 1999; Самойлов, Рыбникова, 2012; Самойлов и др., 2004; Hochachka et al., 1996; Lukyanova, 2004, 2013, 2014; Obrenovitch, 2008).

В результате происходит активация механизмов транспорта кислорода и субстратов обмена веществ к клеткам, сопровождаемая интенсивным расходом энергии, возникает увеличение синтеза нуклеиновых кислот и белков, образующих ключевые структуры клетки (например, митохондриальных белков, сократительных белков и др.).

При этом происходит увеличение срочной толерантности (резистентности) организма к гипоксии, которая начинает формироваться *с первых минут любого гипоксического воздействия и достигает максимальных значений в первые 30-45 минут*. Степень ее выраженности прямо зависит от тяжести гипоксического воздействия в широком диапазоне концентраций кислорода вплоть до его критических значений, в области которых эффективность формирования срочной резистентности снижается.

Срочная резистентность к гипоксии может не закрепляться в клеточной памяти в постгипоксический период и сравнительно быстро возвращаться к исходному уровню.

Ответная реакция дыхательной цепи на срочные гипоксические воздействия, подробно изложенная в разделе 3.5, является наглядным примером *реализации биоэнергетических механизмов срочной адаптации, зависящей от тяжести гипоксии*.

а) В условиях *слабых, пороговых* гипоксических воздействий уже в первые 15 минут формируется *срочная адаптационная стадия* за счет мобилизации физиологических резервных возможностей дыхательной цепи без активации каких-либо дополнительных компенсаторных механизмов. Она характеризуется изменением свойств МФК I (увеличением $V_{\text{макс}}$ ротенончувствительной НАДН-цитохром с оксидоредуктазы, усилением потока электронов от НАД-зависимых субстратов, первичным увеличением содержания АТФ и регуляторным влиянием отношения АТФ/АДФ в контроле синтеза АТФ; увеличением количества мелких митохондрий, повышением плотности матрикса, увеличением по сравнению с нормоксией органелл с плотноупакованными кристами).

б) В условиях гипоксических воздействий *средней* тяжести срочная адаптация формируется за счет *репрограммирования* работы дыхательной цепи (**переключения на сукцинатоксидазное окисление**). Для нее характерно подавление электрон-транспортной функции МФК I и соответственно окисления НАД-за-

висимых субстратов, снижением регуляторного влияния отношения АТФ/АДФ, увеличением внутриклеточного уровня АМФ, усилением регуляторной роли отношения АТФ/АМФ при сохранении стационарных значений суммы аденилатов и энергетического заряда; преобладанием органелл с плотноупакованными кристами, еще большее увеличение популяции мелких электронноплотных митохондрий в КГМ, особенно в КГМ НУ животных. Одновременно наблюдается интенсивная экспрессия фактора HIF-1 α , также более выраженная в КГМ НУ животных, и увеличение общей толерантности животных.

в) При *тяжелой* гипоксии формирование *срочной адаптации* также связано с окислением сукцината, который используется в этом случае не только как энергетический субстрат, но и как механизм восстановления функции МФК I (НАДН-оксидазного окисления). Тем не менее для этого случая характерны линейное снижение содержания АТФ, появление признаков функционального перенапряжения и дезэнергизации митохондрий, а также ультраструктурных нарушений, более выраженных в тканях НУ животных. Тем не менее резистентность к гипоксии все еще формируется.

4.2 Роль митохондрий в формировании биоэнергетических механизмов долговременной (отсроченной) адаптации к гипоксии

Отсроченная (долговременная) адаптация в отличие от *срочной* адаптации формируется при многократном или длительном гипоксическом воздействии на организм и *характеризуется переходом на новый уровень регуляции кислородного гомеостаза*. Она возникает не на основе готовых физиологических механизмов, а на базе вновь сформированных биоэнергетических программ регулирования.

В процессе долговременной адаптации организма энергетический обмен перестраивается в направлении более экономного расходования энергии в состоянии покоя и повышенной мощности метаболизма в условиях физического напряжения. Таким образом, долговременная адаптация сопровождается:

- а) перестройкой регуляторных механизмов;
- б) формированием новых свойств ферментов, позволяющих увеличить эффективность адаптационного процесса.

В отличие от срочной адаптации к гипоксии, при которой ведущее значение имеет активация механизмов транспорта O₂ и субстратов обмена веществ к тканям, основным звеном долговременного приспособления к гипоксии является существенное повышение эффективности процессов биологического окисления в клетках. Это достигается благодаря:

- у увеличению числа митохондрий и количества крист митохондрий;
- увеличению числа молекул ферментов тканевого дыхания в каждой митохондрии, а также активности митохондриальных ферментов;
- повышению эффективности процессов биологического окисления и сопряжения его с фосфорилированием;
- повышению эффективности механизмов анаэробного ресинтеза АТФ в клетках.

Функциональными показателями завершения этого процесса является формирование механизмов, обеспечивающих оптимизацию масс-переносящих свойств крови, увеличение эффективности работы и мощности дыхательной и сердечно-сосудистой систем. При этом происходит снижение температуры тела, потеря веса, увеличение гематокрита, уменьшение скорости дыхания, увеличение концентрации гемоглобина в результате эритропоэза и сродства гемоглобина к кислороду, изменение кинетических свойств ферментов окислительного метаболизма. Последнему сопутствует увеличение эффективности ОФ, появление популяции мелких митохондрий с набором ферментов, позволяющим им работать в новом режиме, ремоделирование сосудов, повышение эффективности гликолиза и транспорта глюкозы через гистогематические барьеры (Меерсон, 1973, 1981, 1993; Лукьянова, 1981, 2011; Лукьянова и др., 1999, 2007, 2012). Одновременно увеличивается толерантность организма к острой гипоксии до уровня, который ранее был несовместим с активной жизнедеятельностью.

Обоснование роли молекулярных механизмов гипоксии в процессе длительной адаптации происходило на протяжении нескольких десятилетий в условиях острых дискуссий со сторонниками исключительно системного подхода к этому вопросу.

Одним из первых исследователей, предположивших, что процесс адаптации к высотной гипоксии может осуществляться не только путем соответствующих системных изменений функционирования на уровне кровообращения и дыхания, но также и путем приспособления самих тканей к недостатку кислорода был Haldans (1927). Однако научно обоснованное развитие представлений о важном значении клеточного уровня адаптации получило в исследованиях Барбашовой З.И. (1960). Ею было показано, что развитие системной адаптации не может быть сведено к простому увеличению мощности транспортных систем дыхания и кровообращения, а сопровождается одновременным повышением резистентности различных тканей к недостатку кислорода, а также увеличением их способности утилизировать кислород из гипоксической среды в экспериментах *in vitro*.

Первые факты, свидетельствующие о возрастании массы митохондрий в тканях и активности основных митохондриальных ферментов при адаптации к высотной гипоксии, были получены еще в 1958 году (Sobol, Cohen, 1958). Авторы показали, что после адаптации в гипертрофированном сердце животных суммарный белок миокарда возрастал на 40%, причем в большей степени во фракциях, ответственных за транспорт и утилизацию кислорода, т.е. содержащих миоглобин и белок митохондрий. Эти данные были подтверждены и дополнены в других работах. Так, например, было установлено, что для различных тканей животных и людей, живших на высоте 4300–4500 м над уровнем моря, характерно увеличенное количество митохондрий на единицу массы сердца при одновременном повышении активности НАДН-оксидазы, НАДН-дегидрогеназы, НАДН-цитохром *c*-редуктазы, СДГ, ЦХО (Хазен, Кузнец, 1958; Hamberger, Nyden, 1963; Harris et al., 1970; Ou et al., 1986).

Электронно-микроскопические исследования также показали, что у адаптированных животных площадь, занятая митохондриями, повышена (Капелько и др., 1968). Увеличение количества белка митохондрий и активности ряда митохондриальных ферментов в расчете на 1 г ткани свидетельствуют

о том, что в результате адаптации к гипоксии возрастает мощность митохондриальной системы окисления и ОФ на единицу массы ткани. Благодаря этому предотвращается падение концентрации богатых энергией фосфорных соединений в тканях при дефиците O_2 .

В 1969 г. Ф.З. Меерсон с соавторами показал, что развитие адаптационных изменений сопровождается активацией синтеза нуклеиновых кислот и белков не только в сердце, но и в мозге (Майзелик и др., 1969; Меерсон, 2009). Эти результаты позволили сформулировать в 1972 году гипотезу о роли биогенеза митохондрий в адаптации организма (Меерсон, 1973). Ее суть сводилась к тому, что главным фактором, обеспечивающим клеточный уровень адаптации, т.е. увеличение способности клеток утилизировать кислород из крови и образовывать АТФ, несмотря на недостаток кислорода, является увеличение мощности митохондриального аппарата. Теоретически это может быть реализовано двумя различными способами.

Во-первых, за счет возрастания сродства конечного фермента дыхательной цепи – ЦХО – к кислороду, благодаря чему акцептор электронов будет использоваться в прежних количествах, несмотря на сниженное напряжение его в клетках. Этот путь подразумевает возникновение или биосинтез качественно измененной ЦХО и, возможно, других ферментов дыхательной цепи. Такой путь принципиально возможен, так как в литературе описаны клинические проявления нарушений митохондриальных функций, связанных с изменениями в структуре фермента.

Второй способ – активация синтеза нуклеиновых кислот и белков митохондрий, приводящая к простому увеличению их количества и массы. Результат такого увеличения состоит в том, что в условиях гипоксии недополучение каждой митондрией кислорода и недовыработка ею определенного количества АТФ будет компенсироваться увеличением числа митохондрий. Т.е. когда при гипоксии дефицит кислорода тормозит транспорт электронов в дыхательной цепи, уменьшается образование АТФ каждой митондрией – ее выход на единицу массы тканей. В ответ на это активируется биогенез митохондрий – их количество на единицу ткани увеличивается, что восстанавливает или даже увеличивает возможность образования АТФ на единицу массы ткани. В итоге АТФ образуется в достаточном для энергозависимых функций количествах. Таким образом, процесс синтеза нуклеиновых кислот и белков, составляющий основу биогенеза митохондрий, предопределяет увеличение мощности системы митохондрий при адаптации к гипоксии и тем самым играет решающую роль в расширении лимитирующего звена процесса – в восстановлении ресинтеза АТФ.

В головном мозге активация синтеза нуклеиновых кислот и белков при адаптации наиболее выражена в коре больших полушарий, где концентрация РНК может возрастать на 50%, а синтез белка – в 2 раза. В нижележащих отделах мозга, менее чувствительных к дефициту кислорода, активация синтеза РНК и белка существенно меньше, а в области вегетативных центров и особенно в продолговатом мозге, где, как известно, локализованы центры дыхания и кровообращения, она наоборот была весьма высокой. Активация синтеза РНК и белка в первые же дни после начала действия гипоксии наблюдается в легких, сердце, костном мозге, сосудах коронарного русла, а также в нейронах симпатических узлов, иннервирующих сердце.

Согласно нашим данным, длительная адаптация к гипоксии приводила к увеличению содержания общего белка в КГМ и печени и одновременно к увеличению содержания цитохромов, в том числе и цитохрома *aa*₃, которое менялось в тканях ВУ и НУ животных одинаково: оно *увеличивалось* при расчете на единицу ткани, что коррелировало с увеличением массы митохондрий в ней, и *уменьшалось* при расчете на единицу митохондриального белка (Дудченко, Лукьянова, 1995, 2004; Дудченко и др., 1993а, б; 1996; Лукьянова и др., 2007). Все это говорит о снижении количества дыхательных переносчиков на цитохромном участке дыхательной цепи. Тем не менее, несмотря на более низкие скорости дыхания, митохондрии адаптированных животных сохраняют высокую эффективность ОФ, что вместе с увеличением общего их количества позволяет компенсировать дефицит внутриклеточного АТФ.

Таким образом, характерная для длительной адаптации к гипоксии *экономизация процесса образования энергии* происходит за счет появления новой популяции митохондрий с новыми свойствами: *сниженным содержанием дыхательных переносчиков на терминальном участке дыхательной цепи и более низкой их окислительной способностью, но работающих в более эффективном режиме, который достигается путем увеличения эффективности ОФ, а также увеличения количества митохондрий в клетке*. В целом оба эти процесса направлены на восполнение потерь АТФ, которое должно было бы происходить в этих условиях. При этом происходят не только количественные, но и качественные изменения свойств ферментов дыхательной цепи и взаимодействия МФК I и МФК II. (Дудченко, Белоусова, Лукьянова, 1996; Дудченко, Лукьянова, 1995; Дудченко, Чернобаева и др., 1993а; Лукьянова, 2004б, 2011; Лукьянова и др., 1999, 2007; Lukyanova et al., 2008, 2010).

Тем не менее следует отметить, что данные литературы о роли энергетического обмена в механизме приспособления организма и его функционирования при низком содержании кислорода в среде достаточно противоречивы. Так, например, до самого последнего времени не было единого мнения по поводу влияния адаптации к гипоксии на процесс ОФ. Согласно одним авторам, оно отсутствует; согласно другим, наоборот, имеется. Изменения становятся, однако, очевидными при разделении животных на ВУ и НУ к гипоксии. При длительной адаптации таких животных в барокамере на высоте 5 000 м их способность переносить критическую высоту (11 000-12 000 м) меняется неодинаково. У НУ она увеличивается, у ВУ не меняется или даже снижается (табл. 8). Все это позволяет предполагать, что кинетические характеристики ферментов дыхательной цепи в процессе адаптации меняются не одинаково у ВУ и НУ животных.

Таблица 8 – Влияние длительной адаптации к гипоксии средней тяжести на резистентность высоко- и низкоустойчивых крыс

Тип животных	Вж ₁ (контроль) (мин.)	Вж ₂ (после адаптации) (мин.)	Эффективность адаптации Вж ₁ / Вж ₂
Низкоустойчивые	1,5 – 3,0	5,3 – 16,5	4,9**
Высокоустойчивые	9,0 – 13,0	4,3 – 22,3	0,96

** P < 0,05

Адаптацию к гипоксии (одночасовое воздействие гипобарической гипоксии – 5000м, эквивалентно 10,5% O₂) проводили ежедневно в течение 30 дней.

Изменения резистентности крыс оценивали по времени жизни (Вж, минуты) на критической высоте (подъем в барокамере на 11 000 м) в конце курсового воздействия.

И действительно, исследования, проведенные Чернобаевой Г.Н. и Романовой В.Е. (1995), показали, что после длительной адаптации к гипоксии скорость окисления НАД-зависимых субстратов в КГМ снижалась, причем у НУ больше, чем у ВУ. Однако эффективность фосфорилирования, оцениваемая по отношению АТР/О, при этом была выше, чем до адаптации. Факт увеличения эффективности работы дыхательной цепи, окисляющей НАД-зависимые субстраты, на фоне снижения ее электрон-транспортной функции свидетельствует об *экономизации* процесса энергообразования в митохондриях КГМ адаптированных крыс. При этом скорость переноса электронов в дыхательной цепи перестает быть предельной, как до адаптации, и появляется «резерв дыхательной активности». «Физиологический» же диапазон дыхательной активности, наоборот, снижался. Все эти процессы были выражены сильнее в мозге НУ крыс. В целом все эти данные говорят о возрастании роли НАД-зависимого окисления в энергетическом обмене при адаптации. Следовательно, сохранение высокой активности именно этого пути имеет принципиальное значение в формировании индивидуальной резистентности мозга к дефициту кислорода.

В основе механизмов этого процесса лежат изменения кинетических параметров МФК I и МФК IV, обусловленные образованием изоформ ферментов с новыми свойствами. Так в мозге адаптированных к гипоксии ВУ крыс V_{\max} и K_m НАДН-цитохром *c* -редуктазы и цитохромоксидазы не менялись, либо снижались, в то время, как в мозге НУ крыс значения V_{\max} НАДН-цитохром *c*-редуктазы и цитохромоксидазы увеличились в 1,5-2,5 раза при снижении K_m (цит.*c*) и приближались к значениям этих параметров в мозге ВУ, либо превышали их. Таким образом в мозге НУ активность этих ферментов в процессе адаптации к гипоксии возрастала, а их сродство к субстратам (НАДН и цитохрому *c*) снижалось (Дудченко, Лукьянова, 1995; Дудченко и др., 1993а, 1996; Лукьянова и др., 1999, 2007; Lukyanova et al., 2010).

Физиологический смысл такой трансформации заключается в том, что оба эти фермента приобретают у адаптированных к гипоксии НУ животных возможность функционировать в более широком диапазоне концентраций своих субстратов (НАДН и восстановленного цитохрома *c*) и с более высокими скоростями. Поскольку в условиях гипоксии пул ПНН и восстановленность цитохромов (в частности цитохрома *c*) увеличивается, появление в этих условиях новых кинетических свойств у НАДН-цитохром *c* -редуктазы и цитохромоксидазы может способствовать более эффективной их работе в условиях дефицита кислорода. Следствием этого может быть увеличение устойчивости митохондрий мозга НУ крыс к острой гипоксии. В мозге ВУ животных такие возможности, видимо, ограничены.

В отличие от этого кинетические характеристики сукцинат-цитохром *c*-редуктазы (МФК II) после завершения длительной адаптации к гипоксии практически не менялись, а потенциальные возможности сукцинатоксидазного пути окисления, выполняющего роль срочного компенсаторного механизма, поддерживающего энергетическую функцию клетки в период срочной адаптации к гипоксии и в процессе формирования долгосрочной адаптации, постепенно уменьшались (Лукьянова, 2004 а).

Подтверждением правомочности всех этих заключений являются полученные нами совместно с Кировой Ю.И. данные о влиянии курсового при-

менения гипобарической гипоксии разной тяжести на динамику содержания субъединиц различных митохондриальных ферментных комплексов.

Так при ежедневном применении *слабого* (порогового) часового гипоксического воздействия (14% O₂, содержание O₂ во вдыхаемом воздухе снижено на 33%) достоверные изменения содержания субъединицы NDUFV2 (МФК I) в КГМ подопытных животных отсутствовали на протяжении всего курса (20) тренировок. Одновременно наблюдалось небольшое (20%) кратковременное (только после 3-го воздействия) увеличение уровня субъединицы SDHA (МФК II). Тем не менее на протяжении всего курсового воздействия содержание субъединиц на цитохромном участке было повышено, а содержание АТФ-азы сохранялось на уровне нормы (рис. 17). Все это свидетельствует о том, что усиление электрон-транспортной функции дыхательной цепи в этих условиях осуществляется без существенного изменения используемых субстратов, но в более эффективном режиме за счет физиологических резервов митохондриальной дыхательной цепи (активации окисления НАД-зависимых субстратов).

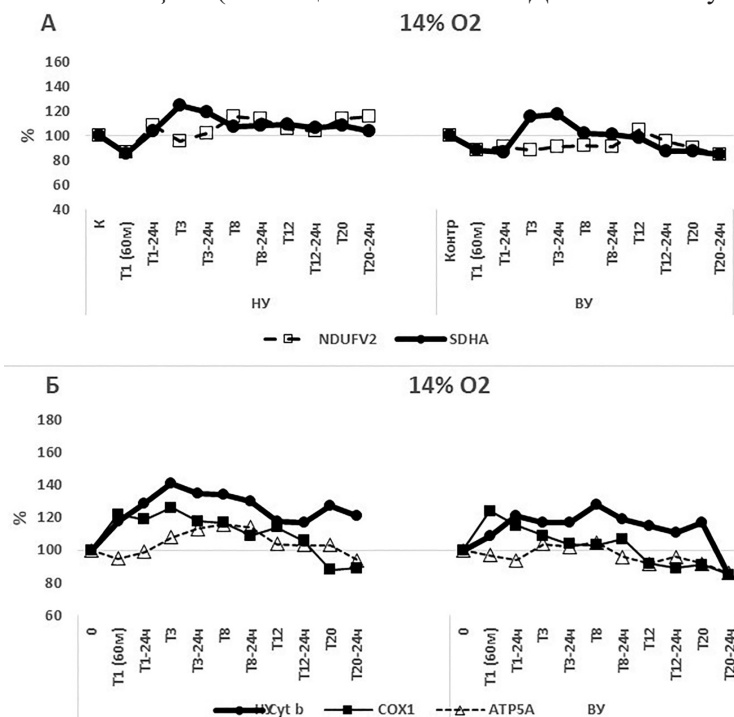


Рисунок 17 – Влияние курсовой гипобарической гипоксии (ГБГ-14% O₂) на динамику содержания измеряемых субъединиц ферментов митохондриальных комплексов (20 ежедневных часовых тренировок).

А – NDUFV2 (МФК I) и SDHA (МФК II);

Б – Cyt b (МФК-III); COX1 (МФК IV) и ATP5A (МФК V) в коре головного мозга низкоустойчивых (HY) и высокоустойчивых (BY) крыс.

T1, T3, T8, T12, T20 – измерение сразу после очередного гипоксического воздействия;

T1-24, T3-24, T8-24, T12-24, T20-24 – измерение через 24 ч после очередного воздействия

При усилении гипоксического воздействия (гипоксия «средней» тяжести -10,5% O₂, снижение содержания O₂ во вдыхаемом воздухе на 50%) дина-

мика содержания ферментов в процессе курсового применения гипоксии характеризовалась двумя фазами (рис. 18).

Первичным *снижением* содержания субъединицы NDUFV2 (МФК I), выявляемым уже после первого гипоксического воздействия, сохраняющимся в течение последующих восьми тренировок и коррелирующим с одновременным увеличением уровня SDHA (МФК II), что отражает ингибирование НАД-зависимого окисления и реципрокную активацию сукцинатоксидазного окисления. При этом электрон-транспортная функция цитохромного участка дыхательной цепи сохраняет высокую активность (достоверное увеличение экспрессии субъединиц Cyt b (МФК III) и COX1 (МФК IV), особенно перые 8 дней воздействия).

Вторичным (после восьми тренировок) *увеличением* экспрессии субъединицы NDUFV2 (МФК I), происходящем на фоне *снижения* экспрессии субъединицы SDHA (МФК II) (восстановление функции МФК I и подавление функции МФК II) (рис. 18). При этом электрон-транспортная функция цитохромного участка остается слегка повышенной, либо нормализуется.

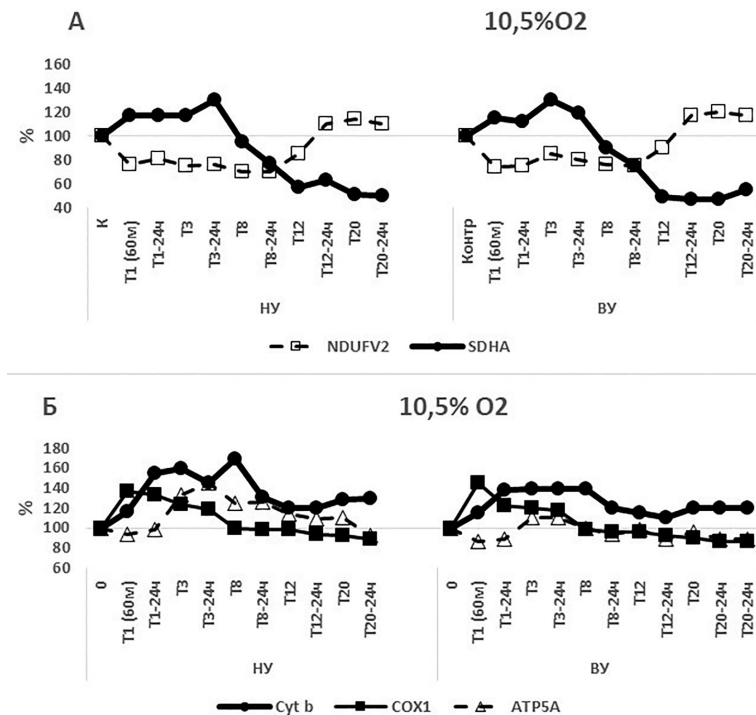


Рисунок 18 – Влияние курсовой гипобарической гипоксии (ГБГ-10,5% O₂) на динамику содержания измеряемых субъединиц ферментов митохондриальных комплексов (20 ежедневных часовых тренировок).

А – NDUFV2 (МФК I) и SDHA (МФК II);

Б – Cyt b (МФК-III); COX1 (МФК IV) и ATP5A (МФК V) в коре головного мозга низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) крыс.

T1, T3, T8, T12, T20 – измерение сразу после очередного часового гипоксического воздействия;

T1-24, T3-24, T8-24, T1-24, T20-24 – измерение через 24 ч после очередного воздействия

Эти данные являются прямым подтверждением того, что в определенном диапазоне сниженных концентраций кислорода действительно происходит компенсаторно-регуляторная смена метаболических путей окисления энергетических субстратов в дыхательной цепи: НАД-зависимого на сукцинатоксидазный (перестройка регуляторных механизмов, формирование новых свойств ферментов, позволяющих увеличить эффективность адаптационного процесса).

Этот эффект, однако, не воспроизводится при «тяжелой» гипоксии (8% O_2 , снижение содержания O_2 во вдыхаемом воздухе на 62%). В этом случае кратковременная *срочная экспрессия* как субъединицы SDHA (МФК II), так и NDUFV2 (МФК I), более выраженная в КГМ НУ, наблюдалась лишь после первого гипоксического воздействия и тотчас же начинала снижаться (рис. 19). Уровень SDHA (МФК II) оставался сниженным на протяжении всех последующих дней курсового гипоксического воздействия, в то время как уровень NDUFV2 (МФК I) восстанавливался до нормы в КГМ ВУ и слегка увеличивался у НУ.

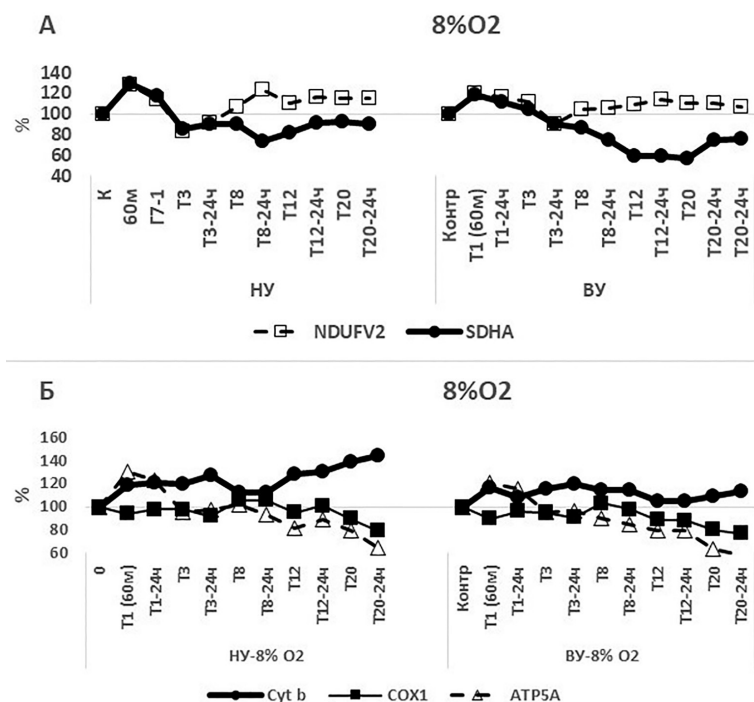


Рис. 19 – Влияние курсовой гипобарической гипоксии (ГБГ-8% O_2) на динамику содержания измеряемых субъединиц ферментов митохондриальных комплексов (20 ежедневных часовых тренировок).

А – NDUFV2 (МФК I) и SDHA (МФК II);

Б – Cyt b (МФК-III); COX1 (МФК IV) и ATP5A (МФК V) в коре головного мозга низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) крыс.

T1, T3, T8, T92, T20 – измерение сразу после очередного часового гипоксического воздействия;

T1-24, T3-24, T8-24, T1-24, T20-24 – измерение через 24 ч после очередного воздействия

Таким образом, роль сукцината как субстрата в энергетическом обмене клетки в этот период снижается, однако одновременно происходит восстановление активности МФК I и возможность окисления НАД-зависимых субстратов.

Что касается цитохромного участка, то в этом случае на протяжении всего курсового воздействия повышенным сохранялось только содержание *сyt b*, хотя оно было значительно менее выражено. Уровень СОХ оставался в пределах нормы до 20-го воздействия, после чего он начинал снижаться, а уровень АТР5А уменьшался после 8 тренировки (рис. 18), что говорит о подавлении активности электрон-транспортной функции цитохромного участка дыхательной цепи.

Эти данные свидетельствуют о том, что существует определенный ограниченный диапазон концентраций кислорода, в котором максимально проявляется компенсаторно-защитная роль сукцинатаксидазного окисления, способствующая формированию толерантности организма к гипоксии.

Таким образом, в условиях долгосрочной адаптации к гипоксии наблюдается постепенная утрата значимости сукцинатаксидазного окисления (Лукьянова, 2004а, 2011; Лукьянова, Коробков, 1981; Лукьянова и др., 2018; Lukyanova, 2004, 2013, 2014).

При этом одновременно происходит постепенное восстановление электрон-транспортной функции НАД-зависимого пути окисления и повышение эффективности работы МФК I. Это может быть связано с тем, что в процессе долгосрочной адаптации появляются новые изоформы основного фермента МФК I с новыми кинетическими свойствами, обеспечивающими повышение эффективности его работы в условиях высокой восстановленности пула ПНН. Сохранение высокой активности МФК II в таких условиях может препятствовать этому процессу.

Длительная адаптация животных к барокамерной гипоксической гипоксии влияет противоположным образом на резистентность ВУ и НУ животных. У НУ она увеличивается, у ВУ не меняется или даже снижается. Это также коррелирует с изменением кинетических свойств ферментов дыхательной цепи.

Таким образом, *срочные и долгосрочные* биоэнергетические механизмы адаптации к гипоксии различаются.

Срочные компенсаторные реакции на ранней стадии гипоксии реализуются в условиях подавления НАДН-оксидазного окисления (МФК I) через активацию сукцинатаксидазного пути окисления (МФК II).

Последнее необходимо также для *формирования в переходный период* регуляторных *биоэнергетических* механизмов, лежащих в основе долгосрочной адаптации (период количественных и качественных изменений свойств ферментов дыхательной цепи и взаимодействия МФК I и МФК II, направленные на *восстановление* НАД-зависимого пути окисления).

Завершение формирования биоэнергетических механизмов долгосрочной адаптации связано с восстановлением НАД-зависимого пути окисления и утратой значимости сукцинатаксидазного окисления.

4.3 Сигнальная роль митохондрий в условиях гипокситерапии

Целебные эффекты горного воздуха известны людям уже на протяжении многих столетий. Однако изучение зависимости этого эффекта от концентрации кислорода, входящего в состав воздуха, было начато лишь в 30-е годы XX в. Первые исследования этого вопроса связывают прежде всего с именем Сиротинина Н.Н. К настоящему времени накоплен огромный экспериментальный материал, свидетельствующий о возможности значительного повышения устойчивости организма различных видов животных и человека к гипоксии, развивающейся в условиях среднегорья и барокамерного разрежения атмосферы (адаптация к гипоксии) (Сиротинин Н.Н., 1934; Барбашова З.И., 1960; Колчинская А.З., Агаджанян Н.А. 1970-2003, Миррахимов М.М., 1970-1990; Меерсон Ф.З., 1965-1998, Лукьянова Л.Д., 1973-2018, Твердохлиб В.П., 1985-1998, и др.). Одновременно барокамерную тренировку (общее снижение барометрического давления и содержания кислорода во вдыхаемом воздухе – *гипобарическая гипоксия*) и дыхание газовыми смесями при нормальном общем барометрическом давлении, но при сниженном парциальном давлении кислорода во вдыхаемом воздухе (*нормобарическая гипоксия*) стали применять в медицинской практике в качестве лечебного фактора (*гипокситерапия*) (Апполонов А.П., 1938; Голубов Н.Н., 1939; Шик Л.Л., 1940; Гуревич М.О., 1941; Сидоренко Г.И., 2010; Твердохлиб В.П., 1990-2003). В послевоенные 20-30 лет гипоксические барокамерные тренировки применялись в режиме ступенчатой адаптации по Сиротинину (постепенное увеличение тяжести гипоксического воздействия в процессе курсовой тренировки). Этот метод использовался для лечения больных бронхиальной астмой, анемией, инсулинозависимыми формами диабета, шизофренией, нарушениями сердечно-сосудистой систем, а также для повышения работоспособности и резистентности летного состава, спортсменов и пр. Позже это явление было заново открыто и описано за рубежом под названием *эффекта прекондicionирования* (Murty, 1986).

Результаты многолетних исследований позволили использовать адаптацию к высокогорному климату для подготовки и тренировки космонавтов.

В 1974 г в России был разработан метод *интервальной нормобарической гипоксии* (Караш и др., 1988; Стрелков и др., 1974; Стрелков, Чижов, 2001). В этом случае для гипоксической тренировки используют газовые смеси в «циклическом» режиме – чередование кратковременного вдыхания гипоксической газовой смеси (12-10% O_2) с кратковременным дыханием воздухом с нормальным содержанием кислорода (20% O_2) (*прерывистая или интервальная гипоксическая тренировка*). В последние два десятилетия этот метод активно использовался за рубежом (Intermittent Hypoxia: from molecular mechanisms to clinical applications, Eds. Lei Xi & Serebrovskaya T.; Nova Science Publishers, New York, USA. 2010; “Intermittent Hypoxia and Human Diseases”. Springer. London 2011. Kurhaliuk et al., 2002).

Очевидно, что практическое использование различных режимов гипоксических воздействий, применяемых в условиях гипокситерапии, требует

знания сравнительных эффектов их влияния на толерантность организма к дефициту кислорода и на динамику формирования как срочных, так и долгосрочных механизмов адаптации. Без этого, так же как и без учета индивидуальной переносимости дефицита кислорода в окружающей среде, невозможен подбор и оптимизация режимов гипоксических воздействий.

На сегодняшний день наиболее актуальными и изучаемыми вопросами, относящимися к проблеме адаптации к гипоксии, по-прежнему остаются: оценка направленности действия на организм различных режимов гипоксических тренировок; проведение сравнительного анализа их эффективности и безопасности применения; изучение физиологических, биохимических и молекулярных механизмов их действия; поиск возможности их оптимизации.

4.3.1 Сравнительный анализ действия разных гипоксических режимов на формирование срочной и отсроченной резистентности организма

Сравнительный анализ действия разных режимов гипоксических тренировок на формирование *срочной* резистентности организма, показал, что оптимальные для этого условия, не вызывающие повреждающих эффектов, реализуются при содержании во вдыхаемом воздухе 12-10% O₂ (Лукьянова и др., 2007, 2009; Стрелков, 1997; Стрелков, Чижов, 2001; Lukyanova et al., 2010, 2011, 2012). Тренировки в условиях интервальной нормобарической гипоксии (ИНГ) состояли из периодически чередующегося пассивного дыхания гипоксической газовой смесью при постоянном давлении, содержащей 10% O₂ (5 минут), и дыхания (3 минуты) атмосферным воздухом (20% O₂). Эта последовательность ежедневно повторялась 6-7 раз (тренировочный цикл), что в целом занимало около часа. Для сравнения проводились одночасовые тренировки в режиме безинтервальной нормобарической гипоксии (10% O₂ (НБГ) и безинтервальной гипобарической гипоксии в барокамере (ГБГ) (тренировка животных на высоте 5 000 м, где содержание O₂ также составляло 10%) (ГБГ) (Лукьянова, Германова, Копаладзе, 2009; Lukyanova et al., 2010).

Для оценки влияния выбранных условий гипоксического однократного и многократного воздействия на резистентность крыс поднимают в барокамере на высоту 11-11,5 тыс. м (острое гипобарическое воздействие) и определяют время жизни до появления 2-го агонального вдоха (Вж) (параметр, характеризующий способность животных к максимальной мобилизации в сублетальный период неспецифических защитных функций организма, прежде всего, дыхательного центра и сердечно-сосудистой системы, ответственных за жизнеспособность организма).

Оказалось, что первичная реакция организма на любое *однократное* неповреждающее (10% O₂) одночасовое гипоксическое воздействие (ГБГ, НБГ, ИНГ) была однотипной и выражалась в увеличении срочной резистентности животных, что и выявлялось уже в первую минуту по окончании тренировки. Однако степень выраженности этой реакции различалась. Максимальные изменения резистентности наблюдались после применения

ГБГ и убывали в ряду ГБГ > НГБ > ИНГ (рис. 20). Изменения качественно были однонаправленными как у НУ, так и ВУ крыс, но количественно у последних они были выражены слабее (рис. 20).

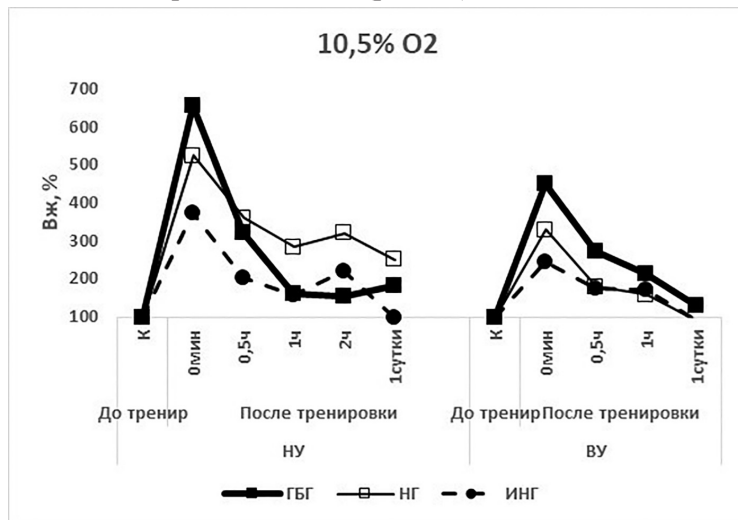


Рисунок 20 – Различия в срочной динамике резистентности ВУ и НУ крыс после однократного часового воздействия разных гипоксических режимов (по Lukyanova et al., 2010, модифицировано)

ВУ – высокоустойчивые, НУ – низкоустойчивые крысы.

Резистентность оценивали по времени жизни (Вж) на критической высоте (11 000 м).

Использовали режимы: гипобарической гипоксии (ГБГ), нормобарической гипоксии (НГБ) и интервальной нормобарической гипоксии (ИНГ); Во всех случаях для тренировки использовали высоту 5 000 м (10,5% O₂).

Тот факт, что после однократной тренировки в безинтервальном режиме (ГБГ, НГБ) увеличение резистентности было больше, чем после ИНГ говорит о том, что, *механизмы, ответственные за формирование срочной адаптации, активируются в гипоксический период*. Более того, наличие оксигенированного интервала не только задерживает, но и угнетает этот процесс (Lukyanova et al., 2007b; 2010). Именно это может быть причиной того, что изменения резистентности животных после однократной тренировки в условиях ИНГ были выражены слабее, чем при безинтервальных гипоксических воздействиях.

В пользу того, что активация механизмов, способствующих срочному формированию резистентности, обусловлена исключительно гипоксическим периодом тренировок, говорит и то, что антигипоксический защитный эффект максимально проявляется сразу после гипоксического воздействия и быстро ослабевает в последующий период.

В течение суток после тренировки наблюдалось волнообразно протекающее снижение резистентности животных, сменяющееся кратковременными периодами ее увеличения. В результате у ВУ животных резистентность возвращалась через сутки к норме. Однако у НУ она оставалась повышенной еще в течение трех суток.

Ответная реакция организма на любое однократное гипоксическое воздействие развивается по типу гипоксического **прекондиционирования** –

адаптивного феномена, возникающего после кратковременного слабого неповреждающего гипоксического воздействия и приводящего к увеличению переносимости последующего отсроченного, более тяжелого воздействия гипоксии (Murry et al., 1986)

При **курсовом** применении разных режимов гипоксических воздействий (20 одночасовых ежедневных тренировок в режиме ГБГ, НБГ и ИНГ при 10% O₂) формирование отсроченных адаптивных признаков различалось.

Так в случае ГБГ увеличение резистентности (двукратное увеличение Вж) наблюдалось у НУ крыс только после трех первых одночасовых тренировок. При продолжении курса тренировок реакция на острое гипоксическое воздействие снижалась. Следовательно, тренировки в режиме ГБГ не были оптимальными и не обеспечивали возможности формирования долгосрочных адаптивных реакций. Причина может быть связана с передозировкой гипоксического стимула при непрерывном его действии и появлением в связи с этим признаков истощения компенсаторных механизмов адаптации.

При курсовом применении НБГ увеличение резистентности НУ крыс было очень кратковременным, и ему предшествовал длительный период ухудшения переносимости гипоксии (Lukyanova et al., 2010; Lukyanova, Kirgova., Germanova, 2012). Наиболее оптимально формирование резистентности у НУ животных протекало при применении ИНГ. В этом случае вплоть до 7-15 тренировок, наблюдалось увеличение Вж в 3-3,5 раза.

Таким образом, и в этом случае более выраженный положительный эффект ИНГ на *формирование неспецифической толерантности может быть связано с оксигенированными интервалами*, которые выполняют, по-видимому, своеобразную регуляторную, нормирующую роль. Они ослабляют эффект гипоксии и предотвращают возможность передозировки раздражающего фактора. При многократном повторении этого эффекта в условиях ИНГ снижение интенсивности гипоксического воздействия за счет оксигенированных интервалов оптимизирует условия, необходимые для формирования долгосрочной адаптации.

Формирование резистентности у ВУ животных отличалось от НУ. У ВУ крыс ни один из режимов курсовой гипокситерапии, в том числе и ИНГ, не приводил к увеличению переносимости острой гипоксии (отсутствие положительных изменений Вж, снижение этого параметра в условиях ГБГ). Однако в области субкритических концентраций кислорода адаптация к гипоксии у ВУ животных, судя по увеличению значений Вж, все же имела место. Максимальное увеличение этого параметра проявлялось после 7 тренировок, однако оно было выражено слабее, чем у НУ крыс (Lukyanova et al., 2010, 2011, 2012).

Таким образом, анализ сравнительных данных действия разных гипоксических режимов на срочную и отсроченную адаптацию организма к гипоксии позволяет сделать несколько принципиальных выводов (Лукьянова, 2011; Лукьянова, Германова, Капаладзе, 2009; Lukyanova et al., 2010, 2012).

1. *Срочная* резистентность к гипоксии начинается формироваться с первых минут любого режима гипоксического воздействия (ГБГ, НБГ, ИНГ) и достигает максимальных значений в первые 30-60 минут.

2. Индукция *срочной* резистентности происходит быстрее при применении безынтервальных форм гипоксии (ГБГ, НБГ) сравнительно с интервальными (ИНГ).

3. Фактором, определяющим *формирование срочной* резистентности, является *гипоксический* период, а не период реоксигенации, который задерживает и угнетает этот процесс; более того, оксигенированные интервалы ослабляют реакцию организма на гипоксию.

4. При *курсовом* применении ИНГ оксигенированные интервалы выполняют, по-видимому, своеобразную регуляторную, нормирующую роль. Они ослабляют раздражающий эффект гипоксии и предотвращают возможность ее передозировки.

5. Динамика формирования неспецифической резистентности организма при применении разных режимов *курсовой* гипокситерапии носит фазный характер, зависящий от типа гипоксического воздействия и фенотипических особенностей животных.

6. Эффект формирования как срочной, так и отсроченной резистентности к гипоксии генетически детерминирован, т.к. убывает в ряду: НУ > ВУ к гипоксии животных.

Независимо от режима гипоксических тренировок и генотипа животных, после 7-15 тренировок наблюдалось снижение ответной реакции организма на острую гипоксию, что может указывать на завершение формирования резистентности в данных условиях, в том числе и при применении ИНГ.

Таким образом, анализ эффектов различных режимов гипокситерапии на резистентность организма позволяет сделать заключение, что *активация механизмов, ответственных за формирование адаптации к гипоксии, происходит в период действия гипоксического фактора и подавляется в период реоксигенации*. Однако именно это создает преимущества курсовому применению ИНГ перед безинтервальными гипоксическими режимами. Оксигенированные интервалы ослабляют раздражающий эффект гипоксического стимула и предотвращают тем самым нежелательные последствия, связанные с его передозировкой. Т.е. они выполняют своеобразное регуляторное, нормирующее действие. Благодаря этому при курсовом применении ИНГ (до 15 тренировок) создаются оптимальные условия, необходимые для формирования долгосрочной адаптации. Очевидна также необходимость дальнейшего изучения роли соотношения гипоксический интервал/оксигенация с целью оптимизации режимов гипокситерапии, а также возможности повышения резистентности ВУ особей.

4.3.2 Особенности работы митохондриальной дыхательной цепи при разных режимах гипокситерапии

В связи с выявленными особенностями формирования резистентности у НУ животных при применении ИНГ сравнительно с другими типами гипоксических воздействий, возникает вопрос, как это отражается на состоянии энергетического аппарата.

Оказалось, что при курсовом применении ИНГ происходили такие же фазные изменения в состоянии МФК I и II в коре головного мозга, как и при ГБГ. Однако при этом имелись существенные количественные различия, позволяющие дать оценку сравнительной эффективности разных режимов гипокситерапии.

Уже через 10-30 минут после первой тренировки при всех режимах гипоксических воздействий (ИНГ и ГБГ) происходило усиление электрон-транспортной функции и увеличение эффективности работы МФК I (Лукьянова и др., 2007). Каких-либо изменений в состоянии МФК II при этом не выявлялось.

Через 2 часа эта активация сменялась снижением эффективности работы МФК I и появлением признаков его дисфункции. Однако, сравнительно с ГБГ, при ИНГ эти нарушения нарастали медленнее (рис. 21).

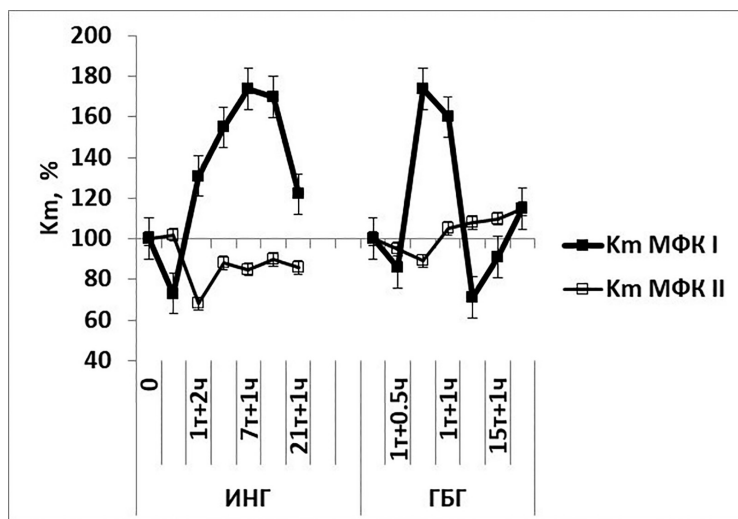


Рисунок 21 – Влияние курсового применения ГБГ и ИНГ на динамику Km ротенончувствительной НАДН-цитохром с- редуктазы (МФК I) и сукцинат-цитохром с-редуктазы (МФК II) в КГМ НУ крыс (по Лукьянова и др., 2007, модифицировано). Оценивали действие гипобарической (ГБГ) и интервальной (ИНГ) гипоксии (одноразовое ежедневное воздействие-10% O₂; максимальное количество тренировок – 21). Увеличение значений Km свидетельствует об уменьшении сродства ферментов к субстрату (НАДН и цит с) и уменьшении эффективности их работы. 1т, 7т, 15т и 21т - число тренировок

Одновременно происходило увеличение эффективности работы МФК II, характерное для компенсаторной стадии энергетических изменений при гипоксии (рис. 21). В случае ИНГ снижение значений Km сукцинат-цитохром с-редуктазы (МФК II) через 2 часа после первой тренировки было значительно больше, чем при ГБГ. Сниженные значения Km этого фермента сохранялись на протяжении всего курса тренировок.

Таким образом анализ влияния разных режимов гипоксических тренировок на состояние субстратного участка дыхательной цепи свидетельствует о том, что при этом происходят качественно однозначные регуляторные перестройки работы дыхательной цепи, направленные на активацию энергетически более эффективного в условиях гипоксии пути окисления субстратов – сукцинатоксидазного (МФК II). Однако, при курсовом применении ИНГ подавление МФК I было выражено слабее, а компенсаторное переключение работы дыхательной цепи на усиление сукцинатоксидазного окисления –

больше, чем при применении других режимов гипоксических тренировок. Т.е. в этом случае эффективность энергетической регуляции была выше. Это коррелировало с высокой резистентностью животных, прошедших курсовую тренировку в этих условиях.

При отсутствии или слабо выраженной активации сукцинатоксидазного окисления, как это имело место в случае с ГБГ, формирование резистентности было затруднено.

В отличие от НУ крыс, в КГМ ВУ животных, у которых не наблюдалось достоверного увеличения резистентности в условиях разных режимов гипоксических тренировок (см. рис. 21), не происходило и достоверных изменений в состоянии МФК II, хотя в первые 10 минут после применения ИНГ отмечалась усиление электрон-транспортной функции МФК I. Следовательно, срочная активация МФК I не связана с формированием системных адаптивных реакций.

Таким образом, очевидна особая роль сукцинатоксидазного пути окисления в адаптивных процессах при гипоксии, что полностью согласуется со всеми более ранними нашими исследованиями. Это же подтверждается экспериментами, в которых введение сукцинатсодержащих препаратов (например, мексидола, проксипина) за 15 минут до тренировки в условиях ИНГ или сразу после нее резко потенцировало формирование срочной резистентности у НУ животных, но не влияло на резистентность ВУ крыс.

Более того, введение животным проксипина на фоне тренировок в условиях ГБГ способствовало восстановлению их способности к адаптации. Без препарата наблюдалось ухудшению переносимости острой гипоксии, которое мы связываем с передозировкой раздражающего гипоксического фактора. Обращает внимание, что сам проксипин и без ГБГ оказывал сильное защитное действие.

Все это подтверждает участие сукцината в механизмах формирования как срочной, так и долгосрочной адаптации организма. Так как его экзогенное введение в организм восстанавливает эту способность, то очевидно, что одной из причин ее снижения или подавления при гипоксии является дефицит эндогенного сукцината, обусловленный, по-видимому, недостаточной скоростью его эндогенного образования.

Таким образом, сукцинат, действительно, необходим для формирования срочных и долгосрочных адаптивных реакций и эффективность гипоксической терапии может быть усилена при сочетанном применении гипоксических тренировок и приема сукцинатсодержащих препаратов.

Этот механизм работает только у НУ животных и практически не реализуется у ВУ особей.

Сукцинатсодержащие препараты успешно используются в России в качестве эффективных антигипоксических средств и применяются в медицинской практике в начальный период острых нарушений, связанных с дефицитом кислорода, в условиях хронической ишемии и пр. (подробно см. гл 6). Терапевтическое применение сукцинатсодержащих препаратов в первые 5 дней глобальной ишемии мозга, при инсульте, инфаркте, острой сердечной недостаточности травматическом шоке, в реанимационном периоде после остановки сердца, в ранний постоперационный период, после наркоза

и пр. оказывает выраженное защитное, антигипоксическое и энерготропное действие (увеличивает содержание АТФ в мозгу). Своевременное применение этого препарата снижает летальность, способствует у большинства пациентов более быстрому и полному регрессу общемозговой и очаговой неврологической симптоматики (Лукьянова, 1989б, 2005, 2009).

4.4 Роль ПОЛ и окислительно-восстановительных процессов при формировании адаптации к гипоксии

В настоящее время широко распространена точка зрения, что постишемические и постгипоксические состояния, связанные с реперфузией и реоксигенацией, сопровождаются инициацией свободнорадикальных процессов, которые выполняют сигнальную функцию в формировании механизмов срочных и отсроченных адаптивных реакций. Защитное действие гипоксического preconditionирования против гипоксических/ишемических повреждений многие авторы также связывают с активацией свободнорадикальных процессов (Chance et al., 1979; Chandel, Schumacker, 2000; De Duve, 1996a; Gusy, Schumacker, 2006; Schieber, Chandel, 2014).

Под гипоксическим preconditionированием понимают действие слабого неповреждающего гипоксического или ишемического стимула, приводящего к увеличению переносимости последующего отсроченного, более тяжелого воздействия гипоксии. Этот прием широко используют в настоящее время в медицинской практике для увеличения неспецифической резистентности организма или отдельных органов к неблагоприятным факторам и различным экстремальным воздействиям и для активации срочных защитных механизмов адаптации. При этом отмечается, что благодаря preconditionированию не развиваются характерные для гипоксии/ишемии функционально-метаболические нарушения, содержание АТФ и дыхательный контроль сохраняются в пределах нормы, отсутствуют нарушения проницаемости наружной и внутренней митохондриальных мембран, изменения мембранного потенциала, выход цитохрома *c*, инициация апоптоза. Тем не менее, четкое представление о механизмах действия preconditionирования отсутствует. Более того, появились работы, в которых ставится под сомнение роль свободнорадикальной активности в период инициации механизмов адаптации (Da Silva et al., 2003; Fan et al., 2008; Serviddio et al., 2005), что делает необходимым проведение дополнительных исследований этого вопроса.

Ранее нами было показано, что preconditionирование в режиме гипобарической гипоксии приводило к увеличению переносимости животными тяжелой гипоксии (т.е. их резистентности), и это свойство было максимально выражено сразу после окончания гипоксического воздействия (Кирова Ю.И. 2015; Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., 2011). У НУ к гипоксии крысы резистентность к гипоксии увеличивалась сразу после 60-минутной тренировки в 6,5 раз, у ВУ – в 3,5 раза. Иницированная preconditionированием срочная резистентность к острому гипоксическому воздействию быстро снижалась в период реоксигенации, достигая минимума через 60 минут. Тем не менее, в этот период она все еще оставалась в 1,5-3 раза выше исходной.

Эти различия в чувствительности животных к гипоксии не были связаны с базовыми особенностями показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности антиоксидантных ферментов. Действительно, оказалось, что в нормоксических условиях ткань мозга (неокортекс) и сыворотка крови контрольных НУ и ВУ к гипоксии крыс значимо не различаются ни по одному из исследованных показателей.

Однократное гипоксическое preconditionирование (10% O₂) значимо не влияло на динамику содержания ТБК-РП и диеновых конъюгатов в неокортексе НУ в первые сутки после воздействия. При этом, однако, наблюдалось снижение содержания гидроперекисей, которое уже на 30 минуте постгипоксического периода достоверно уменьшалось на 25% и оставалось на более низком уровне в последующие 24 часа. В КГМ НУ животных, хотя и наблюдалась тенденция к повышению содержания ТБК-РП через 2 ч. после preconditionирования, но эти изменения не были достоверны. При этом не было зарегистрировано значимых изменений в содержании ни диеновых конъюгатов, ни гидроперекисей. Таким образом, в КГМ как ВУ, так и НУ к гипоксии крыс в первые сутки после однократного гипоксического preconditionирования не было выявлено достоверных признаков активации свободнорадикальных процессов (Кирова, 2015; Лукьянова, Кирова, 2011).

Достоверные изменения продуктов ПОЛ в сыворотке крови НУ крыс также отсутствовали. Однако в сыворотке крови ВУ крыс содержание ТБК-РП достоверно увеличивалось уже через 30 минут после гипоксического воздействия и оставалось повышенным в среднем в 1,5 раза на протяжении суток. Параллельно этому в сыворотке ВУ животных происходило увеличение содержания гидроперекисей, но не диеновых конъюгатов, уровень которых в течение 24 часов постепенно снижался на 50%.

Таким образом, сразу после preconditionирования и в последующие 24 часа статистически значимое увеличение содержания ТБК-РП и гидроперекисей наблюдалось только в сыворотке крови ВУ крыс. Однако оно отсутствовало в КГМ обоих типов животных.

Эти результаты свидетельствуют о том, что: а) однократное гипоксическое воздействие в режиме preconditionирования не обязательно сопровождается активацией свободнорадикальных процессов в тканях, как это показано для тяжелой или длительной гипоксии (Кирова, 2015; Лукьянова, Кирова, 2011); б) различные ткани неодинаково реагируют на гипоксическое воздействие, что может отражать различную степень сбалансированности их антиоксидантных защитных систем; в) у животных, фенотипически различающихся по чувствительности к гипоксии, ранняя реакция процессов ПОЛ даже на сравнительно мягкое гипоксическое воздействие неодинакова; активация продуктов ПОЛ в сыворотке ВУ крыс при отсутствии таких изменений в сыворотке крови неустойчивых к гипоксии животных свидетельствует о большей лабильности свободнорадикальных процессов и более легкой их инициации в условиях гипоксии у высокоустойчивых животных.

Учитывая, однако, что увеличение толерантности к гипоксии под влиянием preconditionирования происходило немедленно после воздействия и было более выражено у НУ крыс, у которых вообще отсутствовали признаки усиления ПОЛ в исследуемых тканях в этот ранний постгипоксический

период, можно предполагать, что *свободнорадикальные процессы не участвуют в механизмах формирования срочной адаптации.*

Различная реакция тканей двух типов животных на гипоксическое прекондиционирование подтверждается исследованиями основных ферментов и систем антиоксидантной защиты. Главным внутриклеточным неэнзиматическим антиоксидантом является восстановленный глутатион – GSH. При усилении свободно-радикальной активности он выполняет функцию либо донора электронов и нейтрализует гидроперекиси и липоперекиси, либо скэвенджера свободных радикалов кислорода. В литературе имеются многочисленные примеры того, что в постгипоксический период происходит снижение его содержания и увеличение уровня его окисленной формы – GSSG, которая считается в связи с этим маркером окислительного стресса (Кирова, 2015, 2016).

Однако в наших экспериментах после гипоксического прекондиционирования в неокортексе обеих групп крыс наблюдалось не увеличение, а снижение содержания окисленного глутатиона (GSSG) и соответственно увеличение отношения GSH/GSSG, особенно выраженное в первые 2 ч. в КГМ НУ животных и свидетельствующее об увеличении восстановленности ткани. У последних оно протекало на фоне отсутствия достоверных изменений в содержании общего глутатиона, а также активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Тем не менее, при этом наблюдалось снижение содержания гидроперекисей и активности каталазы, что может отражать уменьшение образования перекиси водорода в ткани мозга в ранний постгипоксический период.

В неокортексе ВУ крыс изменения в пуле глутатиона (в содержании GSSG, значениях отношения GSH/GSSG) качественно были такими же, но количественно они были выражены гораздо слабее. Кратковременное снижение содержания гидроперекисей в первую минуту после прекондиционирования сменялось нарастающим во времени их увеличением, несмотря на то, что абсолютные значения активности каталазы были выше, чем у НУ крыс.

Выявленные различия в окислительно-восстановительных свойствах ткани мозга у двух типов животных, связанные с функционированием системы глутатиона и проявляющиеся в ранний период после прекондиционирования, позволяют говорить о более сбалансированной системе антиоксидантной защиты в этой ткани у НУ особей, что позволяет в первые часы после гипоксического воздействия поддерживать низкий уровень свободнорадикальной активности (отсутствие изменений в содержании ТБК-РП, снижение содержания гидроперекисей, активности каталазы). Дисбаланс системы развивается, видимо, постепенно, что и приводит через сутки к появлению признаков окислительного стресса.

Сбалансированность антиоксидантной системы в КГМ ВУ крыс выражена гораздо слабее. Это подтверждается меньшими изменениями отношения GSH/GSSG в ранний постгипоксический период, постепенным нарастанием содержания гидроперекисей, высокой активностью каталазы.

В пользу такого вывода говорят и данные по динамике активности СОД в мозге НУ и ВУ к гипоксии крыс.

У ВУ крыс изменения активности СОД в постгипоксический период носили сложный характер: через минуту после гипоксического воздействия активность СОД была повышена (в 1,6 раза) сравнительно с контролем, од-

нако уже через 30 мин и в последующие 2 часа возвращалась к норме, а через сутки вновь увеличивалась в 2 раза. Таким образом, в мозге НУ крыс сразу после гипоксического preconditionирования происходит быстрая нормализация содержания супероксидного аниона, что отражается и на активности фермента. Последующая его вторичная активация может быть признаком развивающегося во времени окислительного стресса.

В отличие от этого у ВУ к гипоксии крыс нормализации активности СОД в коре головного мозга после preconditionирования не происходила. Высокая активность фермента сохранялась на протяжении суток, указывая таким образом на повышенный уровень свободно-радикальной активности в ткани в постгипоксический период.

Наблюдаемые после preconditionирования изменения являются, по-видимому, в первом случае (НУ особи) результатом хорошо отрегулированной и сбалансированной работы системы глутатиона, обеспечивающей, благодаря этому, высоко эффективную антиоксидантную защиту ткани мозга, а во втором (ВУ особи) – ослабление этой функции, что способствует появлению дисбаланса в регуляции и поддержании окислительно-восстановительных свойств ткани, снижение эффективности антиоксидантной защиты ткани мозга.

Таким образом, эти данные позволяют сделать несколько принципиальных выводов.

1. Однократное гипоксическое воздействие в режиме preconditionирования может приводить как к срочной активации, так и подавлению свободнорадикальных процессов. Направленность реакции тканеспецифична, зависит от особенностей метаболизма тканей, их окислительно-восстановительных свойств и соотношения в них про- и антиоксидантных систем.

2. Гипоксическое preconditionирование способствует формированию срочной резистентности организма, более выраженному у НУ к гипоксии животных, в тканях у которых отсутствуют в ранний постгипоксический период признаки окислительного стресса. Наоборот, в тканях ВУ животных, обладающих более низкой способностью к формированию резистентности, гипоксическое preconditionирование стимулирует появление признаков активации свободно-радикальных процессов. Из этого следует, что активация свободно-радикальных процессов в период формирования ранних адаптивных признаков не участвует в инициации срочных механизмов адаптации.

3. Гипоксическое preconditionирование может приводить к противоположным изменениям окислительного метаболизма и состояния антиоксидантных систем в тканях у животных, характеризующихся генетически детерминированными различиями в чувствительности к гипоксии.

Глава V РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТОЧНОМ СИГНАЛИНГЕ

5.1 Сигнальная роль митохондрий в клеточно-межклеточных взаимодействиях

Участие митохондрий в клеточном метаболизме способствовало формированию в процессе эволюции *сигнальных* связей между ними и другими внутри- и внеклеточными системами.

Митохондрии включены в различные сигнальные внутриклеточные каскады через белки (прежде всего ГТФазы, киназы и фосфатазы), обеспечивающие *двунаправленную* связь между митохондриальной сетью и остальными компонентами клетки.

Существует система регуляторного взаимодействия между активацией G1-сопряженных рецепторов внешней мембраны (G1-coupled surface receptors), каскадом PI3K, eNOS, гуанилил циклазой, протеинкиназой G (PKG) и работой митоK_{АТФ}-канала (Bernaudin et al., 2004; Murphy, 2004). В этой цепи PKG является цитозольным компонентом терминального сигнального пути, по которому передается кардиопротекторный сигнал из цитозоля к внутренней митохондриальной мембране, активирующий протеинкиназу C (PKC).

В митохондриях найдены рецепторы глюкокортикоидов, стероидов, эстрогенов, андрогенов, тироидных гормонов. Доказана их регуляторная роль в транскрипционной активности, экспрессии ядерных и митохондриальных генов ОФ, апоптозе, способности активировать Ca-обмен, функцию ОФ, влиять на мембранный потенциал в митохондриях, модулировать синаптическую пластичность, проявлять нейропротекторное действие (Chen, Y. et al. 2011,2012; Du J., et al., 2009; Klinge, 2008; Klinge, Russo, 2009; Nichols, Samantha, 2000; Nishimura et al., 2001; Peers, Kemp, 2001; Porwol et al., 2001; Psarra, Sekeris, 2008; Psarra et al., 2006; Voos, Rotgers, 2002; Wang, Semenza, 1993; Wenger, 2000; Zhu et al., 1999).

Митохондрии активно участвуют в процессе кальциевого гомеостаза, контролируя накопление и выброс ионов Ca²⁺, скорость транспорта которых зависит от мембранного потенциала органелл и концентрации этих ионов в цитозоле (Gunter et al., 2004; Seppet et al., 2001). Выброс ионов Ca²⁺ из саркоплазматического ретикулума стимулирует *кальциевый поток внутрь митохондрий* и приводит к быстрому их накоплению в матриксе. Последнее, в свою очередь, активирует ключевые ферменты дыхательной цепи (пируватдегидрогеназу, цитратдегидрогеназу и α -кетоглутаратдегидрогеназу), что приводит к увеличению продукции АТФ (Kunz, 2001; Saks et al., 2001; Territo et al., 2001).

Одним из главных путей транспорта Ca²⁺ из *цитоплазмы в матрикс* митохондрий является трансмембранный белок, экспрессируемый митохондриями, - Ca²⁺- унипортер (MCU) – *селективный* потенциалзависимый кальциевый канал Ca²⁺ во *внутренней* мембране митохондрий. Его активность регулируется с помощью целого ряда канальных белковых субъеди-

ниц: MICU1, MICU2, MCUb, MiCU2, MCUR1, EMRE, SLC25A23 (Mg^{2+} /ATP- P_i переносчик) (Belosludtsev et al., 2019).

Еще одним путем транспорта Ca^{2+} из цитоплазмы в матрикс митохондрий являются места соприкосновения эндоплазматического ретикулума и внешней мембраны митохондрий (**МАМ контакты**) (Belosludtsev et al., 2019; Saks et al., 2001). За формирование МАМ контактов и регулирование Ca^{2+} -транспорта между органеллами отвечают несколько белков: IP_3R (рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата); в меньшей степени рианодиновый рецептор – RyR ; митофузин 2 (MFN2) и белок 8, содержащий домен PDZ (PDZD8 – PDZ domain-containing protein). Вышедший из ретикулума Ca^{2+} свободно проникает в митохондрии через VDAC канал (порин) внешней митохондриальной мембраны. Взаимодействие IP_3R и VDAC обеспечивается белком – шапероном GRP75 (glucose-regulated protein), который не только физически их связывает в комплекс, но необходим также для их функционального сопряжения, облегчающего поступление Ca^{2+} в митохондрии.

Благодаря МАМ митохондрии и эндоплазматический ретикулум не только совместно регулируют поток кальция, но и обмениваются липидами (Rieusset, 2011). Контакты МАМ являются динамическими структурами, которые чрезвычайно чувствительны к функционально-метаболическим изменениям в клетке. Это, видимо, обуславливает высокую вариабельность состава МАМ, в структуру которых, согласно протеомным исследованиям, входят более 1000 белков (Poston et al., 2013). Однако обязательными для МАМ являются около 70 белков (Raturi et al., 2013).

Митохондрии могут образовывать контакты с плазматической мембраной клеток (**РАМ** – *plasma membrane associated mitochondria*). При этом вследствие активации Ca^{2+} каналов плазматической мембраны концентрация ионов кальция в таких контактах может быть значительно выше, чем в случае МАМ контактов (Giacomello et al., 2010).

Избыточное накопление кальция в митохондриях приводит к формированию в последних пор высокой проницаемости, которые используются для высвобождения Ca^{2+} из матрикса через Na^+ / Ca^{2+} - и H^+ / Ca^{2+} -обменники, либо через РТР (permeability transition pore).

Способность митохондрий не только поглощать, но и выбрасывать Ca^{2+} является важной функцией этих органелл. Именно баланс в работе митохондриальных систем входа и выхода кальция обеспечивает поддержание внутриклеточного кальциевого гомеостаза и функционирование митохондрий в норме и при патологиях.

При тканевой гипоксии происходит одновременное снижение дыхательного контроля и кальций-аккумулирующей способности митохондрий. Потеря митохондриями способности аккумулировать кальций приводит к тому, что попавший в клетку кальций ими не удаляется, что приводит к активации целого комплекса кальций-зависимых ферментных систем, включая фосфолипазы, системы биосинтезов, протеинкиназы.

Митохондрии участвуют в формировании сигнальных путей, контролирующих апоптоз (процесс запрограммированной гибели клетки) (Skulachev V.P., 2006). Их роль в этом процессе обеспечивается присутствием в их матриксе и межмембранном пространстве большого количества биоло-

гически активных веществ (цитохрома *c*; прокаспаз 2, 3, 9; апоптозиндуцирующего фактора (AIF), обладающих выраженным апоптогенным действием). Фактором активации апоптоза является выход данных веществ в цитоплазму при снижении трансмембранного потенциала митохондрий вследствие открытия гигантских митохондриальных пор (выполняющих роль Ca^{2+} -, pH-, потенциал-, НАДФ2Н/НАДФ $^{+}$ - и редокс-зависимых каналов) и повышения проницаемости митохондриальных мембран. К раскрытию пор приводят истощение в клетках восстановленного глутатиона, НАДФН, АТФ и АДФ, образование активных форм кислорода, разобщение ОФ, увеличение содержания Ca^{2+} в цитоплазме.

Таким образом, митохондрии действительно вовлечены в механизмы внутриклеточной и внеклеточной сигнализации и функционируют как активные сигнальные органеллы, принимающие участие в передаче информации по самым различным внутриклеточным сигнальным путям.

Знание механизмов, определяющих функциональную активность митохондрий, либо являющихся причиной митохондриальной дисфункции, является базовым инструментом, необходимым для понимания патогенеза различных заболеваний и создания инновационных технологий их предотвращения, а также для использования показателей активности митохондриальной дыхательной цепи для анализа интегративных функций.

5.2 Сукцинат-зависимые сигнальные пути и их регуляторная роль при гипоксии

5.2.1 Сигнальная роль сукцината в жизнедеятельности организма

Из предыдущих разделов следует, что метаболит ЦТК *сукцинат* (натриевая соль янтарной кислоты) играет особую роль в формировании ответной реакции клетки на срочное и курсовое гипоксическое воздействие. Это эволюционно сложившееся доминирование, названное Кребсом «монополизацией дыхательной цепи сукцинатом» и исследованное впоследствии Чансом (Chance B., Hollunger G., 1961), проявляется прежде всего при гипоксии и в постгипоксический период, а также при физических нагрузках, стрессах, действии адреналина, глюкагона (Дудченко, 1976; Дудченко и др., 1993, 1996; Кондрашова и др., 1973; Кондрашова, Григоренко, 1985; Кондрашова, Маевский, 1978; Лукьянова, 1981, 1984, 1987, 1997; Лукьянова, Власова, 1989; Лукьянова и др., 1995; Маевский и др., 1996, 2000, 2001; Писаренко и др., 1986; Хочачка, Сомеро, 1988; Kondrashova, 1989).

В 1910 году Танберг (Т. Thunberg) обнаружил, что изолированная мышечная ткань животных способна окислять сукцинат. Позже он предположил, что эта дикарбоновая кислота образуется в процессе окисления углеводов. В последующее десятилетие механизм окисления сукцината был изучен более подробно благодаря исследованиям Сент-Дьёрдьи (Albert von Szent-Györgyi). Им была открыта роль сукцината как переносчика водорода

при аэробном дыхании. Впоследствии в конце 30-х годов XX века Кребс описал центральную часть процесса аэробного дыхания – цикл Кребса, также называемый циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) или циклом лимонной кислоты (Krebs, 1970). Он же показал, что некоторые метаболиты цикла Кребса, в том числе сукцинат, могут накапливаться в межклеточном пространстве в условиях ишемии, хотя метаболические причины и последствия этого на тот момент не были полностью ясны. На протяжении многих десятилетий сукцинат рассматривали только как промежуточный продукт цикла Кребса, который считали единственным местом его синтеза.

Фермент, катализирующий эту реакцию, позже был идентифицирован как сукцинатдегидрогеназа, и с 1950-х годов он стал предметом активных исследований. В 1954 году американскому учёному Томасу П. Сингеру впервые удалось выделить очищенную сукцинатдегидрогеназу в виде раствора (Singer et al., 1973). Доступность растворимой формы фермента ознаменовала прорыв в исследованиях, и за последующие пятнадцать лет были идентифицированы все основные компоненты сукцинатдегидрогеназного комплекса. В начале 60-х годов сформировалось представление о дыхательной цепи переноса электронов. В 1962 году удалось выделить три первых дыхательных комплекса. Выделенный из митохондрий комплекс с сукцинатдегидрогеназной активностью получил название дыхательный комплекс II (МФК II) и несколько позже был отождествлён с водорастворимой сукцинатдегидрогеназой.

В настоящее время накоплен огромный банк данных, свидетельствующий о том, что сукцинат принимает участие в важнейших внутриклеточных процессах. Так известно, что сукцинат стимулирует гликолиз и глюконеогенез, обладает антиацидотическими свойствами и оказывает нормализующее действие на буферные свойства крови, увеличивает сродство кислорода к гемоглобину в гипоксических условиях, улучшает оксигенацию тканей, работу сердечно-сосудистой системы как на центральном, так и периферическом участках, увеличивает реабсорбцию фосфата и глюкозы (Кондрашова, 1976, 1991, 2000; Маевский и др., 2001a, б).

Сукцинат участвует в посттрансляционной модификации белков, взаимодействуя с остатками лизина (сукцинирование белков), что сопровождается активацией ферментов глюкозного, липидного метаболизма, ЦТК (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, пируватдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, СДГ) (Park et al., 2013; Zhang et al., 2011).

Сукцинат оказывает ингибирующее действие на пролилгидроксилазы и подавляет аккумуляцию транскрипционного гипоксического фактора HIF-1 α даже в условиях нормоксии (явление псевдогипоксии) (Koivunen et al., 2007; Selak et al., 2005).

Экзогенный сукцинат вовлекается в метаболизм клетки. Энерготропные и антигипоксические эффекты сукцинатсодержащих соединений сопровождаются: 1) выраженными антиоксидантными свойствами; 2) модификацией фосфолипидов, их ресинтезом, что уменьшает ионную проницаемость мембран и выход K⁺ из митохондрий по градиенту концентрации; 3) нормирующим эффектом в обмене кальция; 4) катехоламино-

миметическим, антитератогенным, антитоксическим, гепатопротекторным, антикетогенным, антихолистериногенным действием; 5) удалением избытка ацетил-СоА, сопряженным со снижением избытка липидов и их метаболитов; 6) снижением и нормализацией pH и устранением метаболического ацидоза (Кондрашова, 1971, 1972, 1976, 2000; Кондрашова, Маевский, 1978; Маевский Е.И. и др., 2000, 2001).

Как следует из предыдущих разделов, сукцинат играет особую роль при гипоксии. Так уже в 1966 г было обнаружено, что через 30 сек после полной ишемии мозга на фоне снижения концентрации ряда НАД-зависимых субстратов в ткани мозга, в том числе и α -кетоглутурата, содержание сукцината увеличивается в 1,5 раза (Goldberg, Janet, 1966). Аналогичные данные были получены и в других работах (Hohl et al., 1987; Taegtmeyer, 1978). Образование сукцината при гипоксии может увеличиваться на порядок, что сопровождается его аккумуляцией в цитозоле и в крови, где в нормальных условиях он содержится в следовых количествах (1-20 μ M) (Hems, Brosnan, 1970; Komaromy-Hiller et al., 1997; Kushnir et al., 2001). В перфузируемых тканях его количество еще больше увеличивается в первые 30 минут реоксигенации (Кондрашова и др., 1973; Лукьянова, 1972; Лукьянова, Власова, 1989; Лукьянова и др., 1976, 1999; Маевский и др., 1996, 2000, 200, 2017; Freminet, 1981; Taegtmeyer, 1978). В этот период наблюдается резкое усиление сукцинатзависимого дыхания, что позволило назвать его «сукцинатзависимой постгипоксической активацией» (Лукьянова, Карнаухов, 1976; Лукьянова и др., 1999).

В связи с этим важным моментом является достаточное образование эндогенного сукцината. Источниками эндогенного сукцината являются не только ЦТК, но и метаболические шунты, связывающие ЦТК с обменом аминокислот и гликолизом. Как уже было показано выше (см. раздел 3.5.3) благодаря тканеспецифическим особенностям энергетического обмена, пути образования эндогенного сукцината при гипоксии могут различаться. Тем не менее в их основе лежат аспартат- и глутаматзависимые аминотрансферазные реакции (Кашуро и др., 2010; Кондрашова, 1989, 1991; Кондрашова, Маевский, 1978; Писаренко и др., 1986; Фонсека и др., 2017; Chouchani et al., 2014; Hems, Brosnan, 1970; Hochachka, Dressendorfer, 1976; Hochachka et al., 1996; Taegtmeyer, 1978).

В гипоксическом мозге, например, осуществляется специфическое образование сукцината в цикле Робертса (ГАМК-шунт). Высокая активность трансаминаз и глутаматдегидрогеназы в головном мозге указывает на возможность использования аминокислот данной группы в качестве дополнительного энергетического источника, что особенно важно при различных экстремальных состояниях (Ещенко, 1999).

Анализ вовлечения различных реакций образования эндогенного сукцината при гипоксии и их зависимости от содержания O_2 , а также в анаэробных условиях был проведен в разделе 3.5.3.

Сукцинат плохо проникает через гистогематические барьеры в нормоксических условиях. Однако его аккумуляция в цитозоле и увеличение его концентрации в крови при гипоксии говорят о возможности его межмембранного переноса. В связи с этим в литературе рассматривались возмож-

ные пути его транспорта: 1) за счет увеличения при гипоксии пассивной проницаемости сукцината через мембраны (Маевский и др., 2001; Хочачка, Сомеро, 1988; Hochachka et al., 1996; Taegtmeyer, 1978); 2) его анионного антипорта с малатом (LaNoue, Schoolwerth, 1979); 3) а также транспорта по концентрационному градиенту с использованием транспортеров органических анионов (Fiermonte et al., 1999; Sekine et al., 1998).

Согласно более новым данным транспорт сукцината из митохондриального матрикса в цитозоль может также осуществляться с помощью транспортеров дикарбоновых кислот *внутренней* мембраны митохондрий и через пориновые каналы (VDAS) *внешней* мембраны. В первом случае среди большого количества известных на сегодняшний день дикарбоновых переносчиков наиболее значимым считается транспортер сукцинат-фумарат/малат SLC25A10 (Фонсека и др., 2017). Во втором случае сукцинат транспортируется через белковый канал VDAS, который обеспечивает неспецифический транспорт веществ с молекулярной массой до 1,5 кДа (LaNoue, Schoolwerth, 1979; Oswald et al., 2007). Существует и еще один механизм быстрого *выведения сукцината из цитозоля в кровоток*. Транспортер – белок INDY (от I'm Not Dead Yet = *Я еще не умер*) назван так благодаря тому, что снижение его экспрессии увеличивает продолжительность жизни лабораторных животных. Он является натрий-независимым анионным переносчиком (Knauf et al., 2002).

Транспорт дикарбоновых кислот *внутри клетки* осуществляют также все известные изоформы Na^+ -дикарбоксилатных транспортеров, поскольку для этого необходим градиент ионов Na^+ .

Следует тем не менее отметить, что защитные эффекты сукцината при гипоксии и использование его в качестве лекарственного средства требуют дальнейшего изучения особенностей его межмембранного переноса и уточнения механизмов альтернативных путей его синтеза. Новые задачи появляются и в связи с его рецепторной активностью, благодаря которой сукцинат проявляет гормоноподобное действие и выполняет роль сигнальной молекулы. Последнее неоднократно отмечалось различными исследователями (Деркачев и др., 1996; Кондрашова, 2002 а, б; Kondrashova et al., 1991; Lukyanova, 2013, 2014; Lukyanova, Kirova, 2015; Maevsky et al., 1982).

Наряду с этим сукцинат обладает защитными антигипоксическими свойствами и при его введении в организм увеличивается переносимость животными кислородной недостаточности. Так введение сукцинатсодержащих препаратов (проксипина, аналога мексидола) за 15 минут до подъема в барокамере на критическую высоту, (11500 м, содержание O_2 2-4%), увеличивало ее переносимость как НУ, так и ВУ животными в 1,5 раза и предотвращало снижение макроэргов (АТФ и КФ) в неокортексе крыс (Лукьянова, 1991, 1997, 2004; Чернобаева и др., 1991).

Сукцинат усиливал эффект preconditionирования у НУ животных, независимо от формы гипоксического воздействия (preconditionирование в условиях гипобарической или интервальной нормобарической гипоксии). Более того, его защитное действие в этом случае сохранялось независимо от того, когда он вводился: до или после гипоксического воздействия. Однако защитное действие сукцината у ВУ животных было выражено гораздо слабее или вообще отсутствовало. Следовательно, сукцинат участвует в формирова-

нии срочных механизмов резистентности НУ животных к гипоксии (Лукьянова, 1991, 1997, 2004б; Лукьянова и др., 1990; Чернобаева и др., 1991).

Создание сукцинатсодержащих препаратов, способных проникать через гематоэнцефалический барьер является актуальной задачей современной фармакохимии. Успешным решением этой проблемы является созданный в середине 80-х годов на базе НИИ фармакологии РАМН препарат *мексидол* (сукцинатсодержащее производное 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина). Мексидол обладает хорошей проницаемостью через гематоэнцефалический барьер, высокой биодоступностью и действует на различные мишени, следствием чего является широкий спектр эффектов препарата и высокий терапевтический потенциал (Воронина, 2013; Кондрашова, 1971б, 1972, 1976, 2002; Лукьянова, 1989а, б, 1991; Лукьянова и др., 1976, 1990, 1995; Новиков и др., 1998; Оковитый, Радько, 2015; Чернобаева, Лукьянова, 1989; Шахмарданова и др., 2016; Шустов и др., 2013).

Таким образом, роль янтарной кислоты в организме не ограничивается участием в цикле трикарбоновых кислот. Она выполняет роль сигнальной молекулы.

5.2.2 Митохондрии и транскрипционная активность HIF-1 α

Согласно современным представлениям, ведущая роль в формировании адаптации к гипоксии принадлежит *специфическому белковому фактору, индуцируемому при гипоксии* – HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor). Считается, что этот фактор, открытый в начале 90-х годов (Semenza, 2000, 2002; Semenza G.L., Wang, 1992; Wang, Semenza, 1993), функционирует как главный регулятор кислородного гомеостаза и является механизмом, с помощью которого организм, отвечая на гипоксию, контролирует экспрессию белков, ответственных за механизм доставки кислорода в клетку, т.е. медирует адаптивные ответы клетки на изменения оксигенации тканей (Bruick, 2003; Chavez et al., 2000; Hewitson et al., 2007; Kim et al., 2002; Kolvunen et al., 2005; Schroedel et al., 2002; Selaket al., 2005; Stroka et al., 2001; Semenza, 2011, 2012). Прямыми или опосредованными мишенями HIF-1 являются около 180 генов, экспрессирующих специфические белки, необходимые в условиях сниженного снабжения O₂ для активации альтернативных компенсаторных аэробных и анаэробных реакций, ответственных за синтез энергии и сохранение функциональной активности. Можно выделить четыре основных функциональных групп таких белков, связанных с: 1) ремоделированием сосудистой системы; 2) индукцией эритропоэза; 3) ремоделированием ферментов энергетического обмена; 4) пролиферацией и жизнедеятельностью.

HIF-1 – это гетеродимерный редокс-чувствительный белок, состоящий из двух субъединиц: индуцибельной цитоплазматической кислород-чувствительной субъединицы α , экспрессируемой практически во всех клетках млекопитающих, и конститутивной субъединицы β . Активность HIF-1 зависит преимущественно от субъединицы HIF-1 α , синтез которой контролируется сигнальными системами MAPK и PI3K, активируемыми рецептором тирозинкиназы. Аго-

нистами рецептора являются тирозингидроксилаза, цитокины, факторы роста (например, инсулиноподобный фактор), а также сукцинат. В норме внутриклеточный уровень субъединицы HIF-1 α низкий, так как она подвергается протеасомной деградации в кислородзависимых реакциях пролилгидроксилирования и убиквитинации (E3-убиквитин лигазой). При гипоксии создаются предпосылки инактивации пролил-гидроксилазных реакций, что способствует стабилизации и накоплению HIF-1 α , индукции транскрипции, транслокации HIF-1 α в ядро, его гетеродимеризации с субъединицей (HIF1 β /ARNT), образованием активного комплекса транскрипции HRE, экспрессией HIF-1 α зависимых генов-мишеней и синтезом защитных адаптивных белков (Semenza, 2000, 2004, 2009, 2011, 2012) (рис. 22).

Несмотря на запрограммированную O₂-зависимую деградацию, в условиях нормоксии, HIF-1 α идентифицируется в разных тканях, но более всего в КГМ и миокарде (Кирова, 2012, 2016; Лукьянова и др., 2012, 2013; Stroka et al., 2001). Таким образом, его распределение *тканеспецифично*. Все это свидетельствует о вовлеченности HIF-1 α в механизмы функционирования тканей в условиях физиологической нормы.

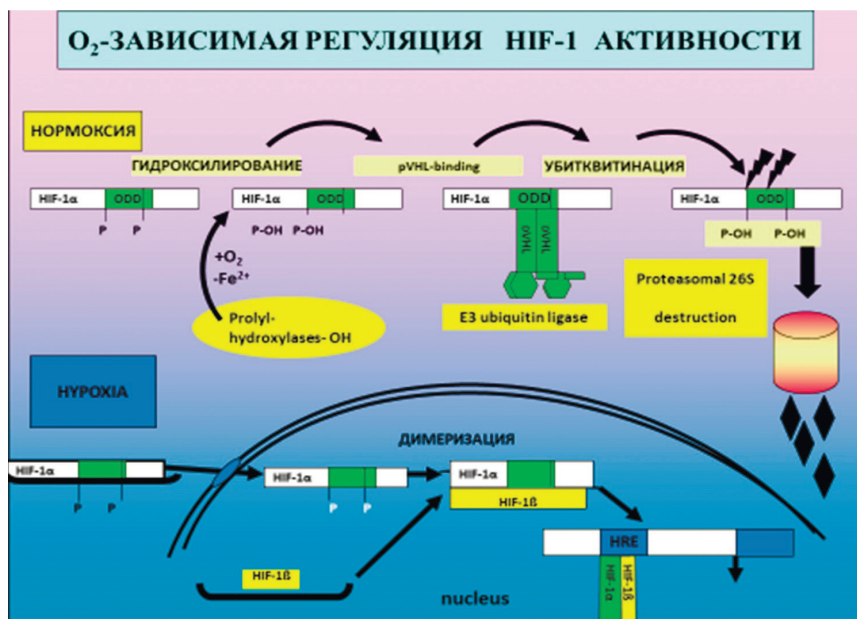


Рисунок 22 – Процесс гидроксилирования гипоксического фактора HIF-1 α в гипоксических условиях

Существуют фенотипические различия в базовом содержании HIF-1 α тканях: у ВУ оно меньше, чем у НУ. Наиболее отчетливо фенотипические различия проявляются в КГМ. Более того, установлена обратная зависимость между базовым содержанием HIF-1 α в нейронах КГМ и толерантностью животных к гипоксии: наиболее интенсивная базовая экспрессия HIF-1 α в нейронах характерна для КГМ НУ к гипоксии животных. Эти данные могут свидетельствовать о существенно большей

функциональной значимости системы HIF-1 α для нейронов КГМ НУ крыс сравнительно с ВУ (Кирова и др., 2014).

Тканеспецифические и фенотипические различия в содержании HIF-1 α проявляются не только при нормоксии, но и при гипоксии. *Срочная* гипоксическая экспрессия HIF-1 α в ответ на однократное гипоксическое воздействие индуцируется во всех исследуемых тканях НУ животных в ограниченном диапазоне сниженных концентраций O₂ во вдыхаемом воздухе, специфичном для каждой ткани. Наиболее выраженная зависимость срочной экспрессии HIF-1 α от концентрации O₂ характерна для КГМ НУ крыс (Лукьянова и др., 2012, 2013). В этом случае индукция HIF-1 α быстро (в течение 30-45 минут) развивается при неповреждающих гипоксических воздействиях (ГБГ₃₀₀₀-14%O₂ и ГБГ₅₀₀₀-10,5%O₂), достигая максимальных значений в течение часа, и коррелирует с формированием срочной защитно-адаптивной резистентности этих животных к дефициту кислорода. В отличие от этого срочная экспрессия HIF-1 α в КГМ и миокарде ВУ крыс в аналогичных гипоксических условиях не развивается. В печени НУ и ВУ крыс срочная индукция HIF-1 α отсутствовала на фоне слабого гипоксического воздействия (ГБГ₃₀₀₀-14%O₂), но развивалась при гипоксии средней тяжести (ГБГ₅₀₀₀-10,5%O₂). При этом фенотипические различия отсутствовали.

Таким образом, система HIF-1 α используется при формировании срочных механизмов адаптации преимущественно у одного фенотипа – НУ животных. Следовательно, высокая исходная толерантность к гипоксии ВУ животных обеспечивается другими механизмами. Тот факт, что индукция системы HIF-1 α как в нормоксических, так и гипоксических условиях максимально выражена в нейронах КГМ НУ крыс, говорит об особой роли КГМ в формировании системного ответа НУ особей на гипоксию.

В условиях *тяжелой* гипоксии (ГБГ₇₀₀₀-8%O₂) индукция HIF-1 α в тканях НУ и ВУ крыс была кратковременной и сменялась (в КГМ через 60 минут) падением уровня HIF-1 α существенно ниже базового. Следовательно, протективные и проадаптивные эффекты HIF-1 α в условиях тяжелой гипоксии не реализуются.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что *оптимальным гипоксическим режимом для индукции срочной экспрессии HIF-1 α во всех исследованных тканях является часовое воздействие ГБГ₅₀₀₀-10,5% O₂.*

При *многократном (курсовом)* ежедневном одночасовом применении неповреждающих гипоксических воздействий срочная и отсроченная (через 24 часа после воздействия) гипоксическая экспрессия HIF-1 α развивалась в КГМ и миокарде НУ крыс после каждого очередного воздействия лишь на протяжении первых 8 воздействий, что совпадало с периодом формирования *отсроченной* толерантности организма к дефициту кислорода. Снижение ее интенсивности при последующих гипоксических воздействиях может отражать завершение формирования адаптации организма НУ крыс к гипоксическому стимулу заданной силы, продолжительности и частоты. То, что адаптивное повышение уровня HIF-1 α при курсовом гипоксическом воздействии - явление преходящее, может иметь защитное действие, так как ограничивает возможность неконтролируемого развития пролиферативных процессов, инициирующих канцерогенез.

В КГМ и миокарде ВУ крыс в условиях многократных неповреждающих гипоксических воздействий индукция HIF-1 α отсутствовала, также как при однократном воздействии.

Кислород-зависимый процесс пролил-гидроксилирования и протеасомной деградации HIF-1 α , протекающий в цитозоле, сопряжен с утилизацией НАД-зависимого субстрата цикла Кребса – α -кетоглутарата, в то время как другой субстрат ЦТК – сукцинат является аллостерическим ингибитором этого процесса (Hewitson et al., 2007; Kolvunen et al., 2007; MacKenzie et al., 2004; Selak et al., 2005; Semenza, 2004). При гипоксии содержание α -кетоглутарата снижается, а синтез сукцината усиливается. В силу этого создаются предпосылки (наряду с дефицитом O_2 и Fe^{2+}) для инактивации пролилгидроксилазных реакций и стабилизации HIF-1 α , его накопления и усиления его транскрипционной активности. В таком случае должна существовать зависимость между активацией сукцинатаксидазных путей окисления при гипоксии и образованием HIF-1 α . Это позволяет предполагать, что гипоксическая экспрессия HIF-1 α может быть связана с репрограммированием работы дыхательной цепи (подавлением активности МФК I и окисления НАД-зависимых субстратов и активации МФК II и сукцинатаксидазного окисления).

Экспериментальная проверка этого предположения с помощью ингибиторного анализа полностью его подтвердила (Кирова, 2016; Кирова и др., 2013, 2014; Лукьянова и др., 2012 Kirova et al., 2014; Lukyanova, 2012, 2014; Lukyanova, Kirova, 2015). Это позволяет сделать вывод, что *срочная сукцинатзависимая гипоксическая экспрессия HIF-1 α в КГМ регулируется состоянием субстратного участка митохондриальной дыхательной цепи: ее индукция усиливается при активации МФК II и подавлении активности МФК I.*

При тяжелых формах гипоксии способность к экспрессии HIF-1 α и формированию срочной и долгосрочной резистентности у НУ животных нарушается. Если однако переключения работы дыхательной цепи при гипоксических воздействиях от МФК I к МФК II не происходило, как, например, в КГМ ВУ к гипоксии крыс, аккумуляция HIF-1 α была снижена, либо вообще отсутствовала, и ни срочная, ни долгосрочная резистентность не формировались.

В свою очередь, HIF-1 α может влиять на работу дыхательной цепи через активацию пируватдегидрогеназы киназы I: он способствует ингибированию пируватдегидрогеназы и тем самым подавляет окисление пирувата, что может быть одной из причин инактивации МФК I (Kim et al., 2002).

Таким образом, существует *сопряженность в функционировании митохондриальной дыхательной цепи и транскрипционной экспрессии индуцируемых гипоксией генов в условиях гипоксии, в которой субстраты цикла Кребса выполняют сигнальную функцию и регулируют активность пролилгидроксилазных реакций.* Все эти факты свидетельствуют об участии митохондриальной дыхательной цепи и ее субстрата сукцината в регуляции транскрипционной экспрессии индуцируемых гипоксией генов. Взаимодействие этих систем показано на рис. 23.

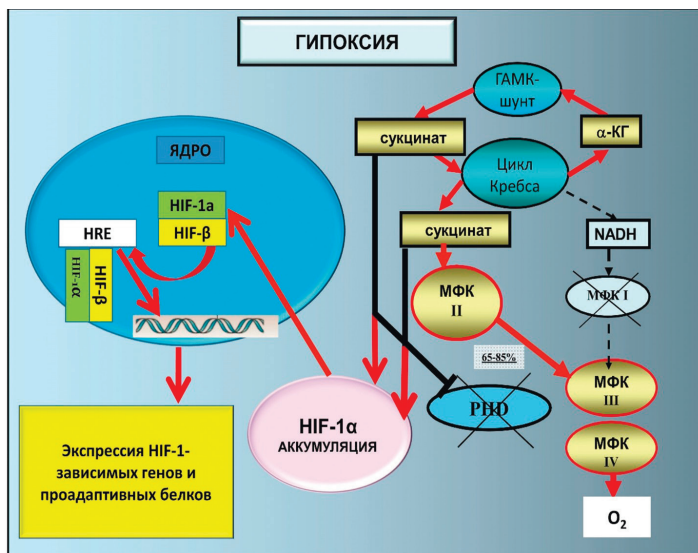


Рисунок 23 – Влияние регуляторного репрограммирования работы дыхательной цепи митохондрий и ГАМК-шунта на гипоксическую экспрессию и активность HIF-1α

Еще одним источником сукцината в КГМ может быть специфичный для мозга ГАМК-шунт или цикл Роберта (Лабори, 1970; Roberts, Frankel, 1950; Roberts et al., 1958) – механизм образования при различных видах стресса и, прежде всего, при гипоксии, нейромедиаторов – глутамата и ГАМК (Wood, Watson, 1963). В результате его активации образуется сукцинат, который может быть использован в качестве субстрата при гипоксической активации МФК II (рис. 24).

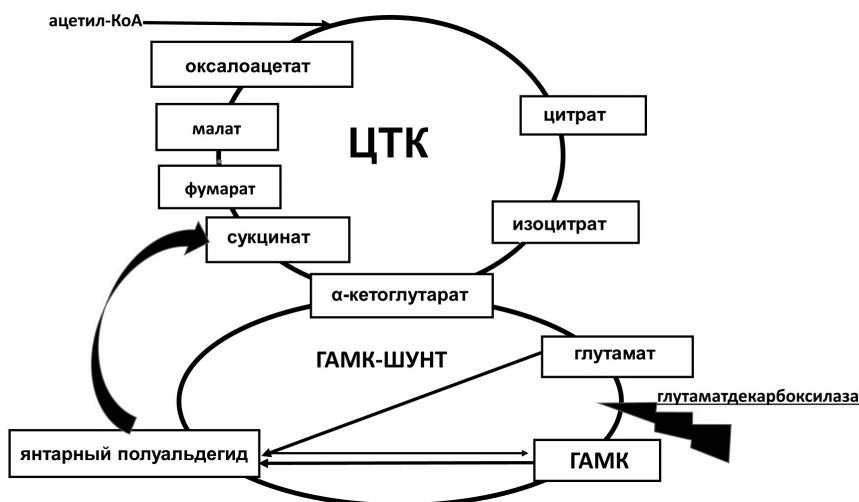


Рисунок 24 – Образование сукцината в системе ГАМК-шунта

И действительно, введение животным тиосемикарбазида – ингибитора одного из начальных ферментов этого метаболического пути *глутаматдекарбоксилазы* – сопровождалось снижением содержания сукцината и HIF-1 α в КГМ обоих фенотипов крыс. Эти данные свидетельствуют о том, что сукцинат, продуцируемый в цикле Робертса, участвует в формировании срочной гипоксической экспрессии HIF-1 α в КГМ НУ и ВУ крыс (Кирова, 2012, 2016; Лукьянова и др., 2012, 2013; Lukyanova, Kirova, 2015; Lukyanova et al., 2014).

Таким образом, в условиях *in vivo* срочная сукцинатзависимая экспрессия HIF-1 α при гипоксии контролируется в КГМ по крайней мере двумя различными механизмами образования эндогенного сукцината, выполняющего сигнальную функцию: а) в цикле Кребса при активации СДГ и б) за счет функционирования специфического для мозга ГАМК-шунта, обеспечивающего в этих условиях дыхательную цепь сукцинатом.

Следует отметить различную активность ГАМК-шунта в КГМ двух фенотипов животных: оказалось, что его функционирование при гипоксии на фоне предварительного введения животным ингибитора глутаматдекарбоксилазы независимо от тиосемикарбазида и сопряженное образование сукцината у ВУ крыс сохранялось в 6 раз дольше, а отрицательное влияние гипоксии было выражено слабее, чем у НУ крыс. Предположительно различия могут быть связаны с неодинаковой исходной активностью у животных глутаматдекарбоксилазы, которая подавляется при тяжелой гипоксии (Anju et al., 2010).

Все это, в свою очередь, еще раз подтверждает вывод о существовании различных механизмов формирования адаптивных реакций в КГМ ВУ и НУ животных с участием HIF-1 α .

Сопряженность экспрессии HIF-1 α с формированием адаптивных признаков при гипоксии подтверждается наличием высокой корреляции между гипоксической и постгипоксической динамикой этого фактора и динамикой фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) – маркера ангиогенеза. В настоящее время связь этих двух процессов является предметом дискуссий в связи с противоречивостью имеющихся экспериментальных данных: индукция VEGF показана как в условиях индукции HIF-1 α (Semenza et al., 2006), так и независимо от HIF-1 (Sapich P., 2012).

Согласно данным, полученным нами в тканях НУ животных, срочная индукция HIF-1 α с высокой достоверностью ($p < 0,01$) коррелировала ($r > +0,9$) не только с увеличением общей резистентности НУ крыс к острой гипоксии, но и увеличением уровня VEGF. Однако положительная корреляция между динамикой срочной гипоксической экспрессии HIF-1 α и VEGF в условиях применяемых нами режимов гипоксии, свидетельствующая о HIF-1 α -зависимой индукции VEGF, наблюдалась лишь в ограниченном диапазоне концентраций O₂ во вдыхаемом воздухе (ГБГ₅₀₀₀, 10,5% O₂). Таким образом, в тканях НУ крыс при гипоксии средней тяжести HIF-1 α вовлекается в процесс формирования адаптивных признаков (Кирова, 2012, 2016; Кирова и др. 2012, 2015; Lukyanova, Kirova, 2015; Lukyanova et al., 2014).

В отличие от этого, в КГМ и миокарде ВУ крыс в условиях многократных воздействий неповреждающих режимов гипоксии, так же как при од-

нократном гипоксическом воздействии, индукция HIF-1 α отсутствовала. Резистентность животных к острой гипоксии также не менялась, тем не менее содержание VEGF в КГМ и миокарде значимо увеличивалось, что свидетельствует о возможности инициации в этих тканях ВУ крыс HIF-1 α -независимых механизмов адаптации к гипоксии.

Таким образом, при гипоксии в условиях *in vivo* в нейронах КГМ НУ животных реализуется сложная, многокомпонентная система срочного регулирования стабильности HIF-1 α , обеспечивающая оптимальные условия для экспрессии HIF-1 α -зависимых адаптивных генов.

Следует отметить, что положительная корреляция между срочной гипоксической экспрессией HIF-1 α и VEGF, показанная многими авторами и свидетельствующая о возможной роли HIF-1 α как индуктора VEGF, в условиях применяемых нами режимов гипоксии наблюдалась лишь в очень ограниченном диапазоне концентраций O₂ во вдыхаемом воздухе (ГБГ₅₀₀₀, 10,5% O₂) и преимущественно в КГМ.

Кроме того совершенно очевидны принципиальные различия в механизме формирования толерантности животных к дефициту кислорода. Так, для КГМ НУ крыс сравнительно с ВУ характерны:

- более выраженное увеличение образования сукцината при гипоксии, коррелирующее с более интенсивной срочной гипоксической экспрессией HIF-1 α ;
- увеличение активности СДГ в условиях гипоксии (при отсутствии изменений этого показателя в КГМ ВУ);
- более выраженная зависимость гипоксической экспрессии HIF-1 α от активности ГАМК-шунта;
- более высокая чувствительность НУ крыс к дефициту ГАМК.

Индукцируемая гипоксией сукцинатзависимая срочная экспрессия транскрипционного фактора HIF-1 α тканеспецифична, фенотипична, дозозависима. Гипоксическая активация этой системы в КГМ – мишени для HIF-1 α – характерна для НУ к острой гипоксии крыс, имеет короткий латентный период (30 минут), развивается в широком диапазоне сниженных концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе, подавляется при тяжелых формах гипоксии, сопровождается формированием срочной и отсроченной защитно-адаптивной резистентности этих животных к дефициту кислорода, зависит от активности как сукцинатоксидазного окисления (МФК II), так и ГАМК-шунта и индуцируется сукцинатсодержащими препаратами, т.е. регулируется сукцинатом эндогенного и экзогенного происхождения.

5.2.3 Митохондрии и особенности экспрессии сукцинат-зависимого рецептора GPR91 (SUCNRI) при гипоксии

Репрограммирование работы дыхательной цепи в условиях гипоксии и переключение на сукцинатоксидазный путь окисления создает предпосылки для индукции в этих условиях еще одного сукцинат-зависимого сигнального пути – экспрессии рецептора GPR91.

Рецепторы, сопряженные с G белком, (*G protein-coupled receptors, GPCRs*), также известные как *семистиральные рецепторы* или *серпентины*, обнаружены только в клетках эукариот и составляют большое семейство трансмембранных рецепторов, выполняющих функцию активаторов внутриклеточных путей передачи сигнала. Лиганды, которые связываются и активируют эти рецепторы, включают гормоны, нейромедиаторы, светочувствительные вещества, пахучие вещества, и варьируют в своих размерах от небольших молекул и пептидов до белков. Нарушение работы GPCR приводит к возникновению множества различных заболеваний, а сами рецепторы являются мишенью до 40 % выпускаемых лекарств.

В 2004 г. впервые было показано, что сукцинат и α -кетоглутарат – субстраты ЦТК, являются специфическими лигандами метаботропных пуриnergических G-белок-сопряженных рецепторов GPR91 (или SUCNR1) и GPR99, локализованных в плазматической мембране. Несмотря на то, что GPR91 на 33% гомологичен GPR99, при определении степени аффинности оказалось, что сукцинат взаимодействует только с GPR91, в то время как α -кетоглутарат является лигандом только для GPR99 (He et al., 2004). Установлено, что EC₅₀ (полумаксимальная эффективная концентрация лиганда) для пары сукцинат–GPR91 составляет 20–50 мкмоль. При этом была исследована аффинность различных веществ, в том числе фармакологических субстанций, а также карбоновых кислот, близких по строению к сукцинату, для различных сопряженных с G-белком рецепторов. Некоторые из тестируемых соединений были способны связываться с GPR91, однако значительно хуже, чем сукцинат (He et al., 2004).

Стимулируемая сукцинатом экспрессия рецептора GPR91 сопряжена с активацией Gq/11, G_o and G_i, а также PI3K и ERK сигнальных путей (He et al., 2004; Vargas et al., 2009). После запуска сигнального каскада в результате взаимодействия GPR91 с лигандом происходит его интернализация в эндосомы (He et al., 2004; Arisa et al., 2012).

Сукцинат-зависимый рецептор GPR91 идентифицирован более чем в 20 тканях (Кирова и др., 2015; Оковитый и др., 2015; Stroka et al., 2001). Спектр его локализации постоянно расширяется. Известно, однако, что его рецепторно-сигнальная функция тканеспецифична (Кирова, 2016; Лукьянова и др., 2015; He et al., 2004).

Наиболее исследована роль GPR91 в почках, где его сукцинат-индуцированная экспрессия вовлекает ренин-ангиотензиновую систему и способствует развитию почечной гипертензии, заболевания, тесно связанного с атеросклерозом, диабетом и почечной недостаточностью (Correa et al., 2007; Deen, Robben, 2011; He et al., 2004; Sadagopan et al., 2007; Saphiha et al., 2008; Toma et al., 2008; Vargas et al., 2009). Эта активация является звеном специфического для почек паракринного сигнального пути, инициируемого высокой концентрацией глюкозы. GPR91-сигнальный каскад в почках включает локальную аккумуляцию сукцината, экспрессию и интернализацию в эндотелиальных клетках почечных канальцев рецептора GPR91, увеличение эндотелиального Ca²⁺, образование NO и простагландина E₂ и их паракринное действие на смежные ренин-продуцирующие клетки. Этот каскад может модулировать функцию почек и способствовать удалению различных продуктов метаболизма путем гиперфильтрации.

Сукцинат-зависимая экспрессия GPR91 обнаружена в слое ретинальных ганглиев у грызунов (Saphiha et al., 2008), где он активирует продукцию различных ангиогенных факторов, включая VEGF, регулирует рост сосудов, способствует васкуляризации. Аналогичную функцию GPR91 выполняет в дендритных клетках при ишемии, где он выступает также в роли триггера мобилизации Ca^{2+} и индукции провоспалительных цитокинов (Rubic et al., 2008). При инфаркте мозга GPR91 экспрессируется в нейронах и астроцитах пенумбры и стимулирует увеличение плотности микрососудов (Hamel et al., 2014). Установлена его роль в стимуляции роста гемопоэтических прогениторных клеток (Nakak et al., 2009). При ишемии печени GPR91 экспрессируется только в звездчатых клетках органа (Correa et al., 2007). Сукцинат-зависимый эффект в этом случае не связан с гипертензией. Рецептор преобразует сигнал, получаемый при увеличении внеклеточной концентрации сукцината, во внутриклеточный, который способствует активации звездчатых клеток в ответ на повреждение органа (Li et al., 2015). Таким образом, и при ишемии печени действие сукцината следует рассматривать, как паракринный сигнал. Рецептор, однако, не был обнаружен в гепатоцитах, холангиоцитах, портальных фибробластах и купферовских клетках (Correa et al., 2007).

Данные о функциональной роли GPR91, однако, не дают ответа на вопрос, какое место рецептор занимает в ответной реакции организма на гипоксию и как взаимодействует с другими сигнальными системами.

Исследования, проведенные в нашей лаборатории (Кирова, 2016; Лукьянова и др., 2015; Lukyanova, Kirova, 2015) показали, что в нормоксических условиях сукцинат-зависимый рецептор GPR91 выявляется во всех исследованных аэробных тканях, но отсутствует в эритроцитах, не содержащих митохондрии. Наибольшая его плотность обнаружена в миокарде (в 1,7 и 2,7 раза больше, нежели в КГМ, в печени и почках соответственно). Таким образом, в нормоксических условиях наибольшая плотность GPR91 характерна для миокарда и КГМ, но не для почек и печени, как следует из работы (He et al., 2004).

Гипоксические воздействия способствуют тканеспецифической индукции срочной экспрессии GPR91. Этот процесс зависит от длительности и тяжести гипоксического воздействия (Кирова, 2016; Лукьянова и др., 2015; Lukyanova, Kirova, 2015). При самом мягком режиме гипоксии (ГБГ, 3000 м, эквивалентно 14% O_2) срочная экспрессия GPR91 наблюдалась только в КГМ НУ крыс. Недостоверное ее увеличение происходило уже через 15 минут после начала гипоксического воздействия, а через 45 минут оно составляло 20-30%. При более длительном гипоксическом воздействии степень плотности рецептора уменьшалась и через 4 часа она возвращалась к исходным значениям. Экспрессии GPR91 в КГМ ВУ крыс в этом случае была недостоверной. В миокарде и печени экспрессия рецептора при этом гипоксическом режиме отсутствовала.

При ГБГ *средней* тяжести (5000 м, 10,5% O_2) увеличение экспрессии GPR91 в КГМ как НУ, так и ВУ крыс через 15 минут ее действия составляло 20-30%, через 45-60 минут – 40-60%, через 2 часа плотность GPR91 увеличивалась в 2,2 раза сравнительно с базовыми значениями. Однако, к 4-му

часу действия ГБГ плотность GPR91 начинала снижаться. В печени срочная экспрессия GPR91 через 15 минут после начала ГБГ не превышала 17-23% и сохранялась на этом уровне в последующие 3 часа. Небольшое ее увеличение (до 40-45%) происходило лишь через 4 часа. В миокарде, несмотря на очень высокий базовый уровень GPR91, его экспрессия в ответ на этот режим ГБГ начиналась только через час и в последующие 3 часа действия ГБГ не превышала 20-25%. Различия в ответной реакции у НУ и ВУ крыс отсутствовали во всех тканях.

При действии *тяжелой* ГБГ (7000м, 8% O₂) скорость срочной экспрессии GPR91 в КГМ как НУ, так и ВУ крыс в первые 45 минут была даже больше, чем в предыдущем случае (увеличение плотности GPR91 на 70%). Однако продолжительность экспрессии сокращалась вдвое. После 60 минут действия ГБГ плотность GPR91 начинала снижаться и через 4 часа она была на 10-15% ниже исходного. Срочная экспрессия GPR91 при тяжелой ГБГ наблюдалась и в миокарде, где уже через 15 минут она достигала максимальных значений, увеличиваясь вдвое сравнительно с базовыми значениями, после чего начиналось постепенное ее снижение. Через час плотность рецептора возвращалась к исходным значениям, а через 4 часа снижалась еще на 15-20%. Однако в печени, в отличие от КГМ и миокарда, срочная экспрессия GPR91 при данном режиме гипоксического воздействия не развивалась вообще. Низкая экспрессия GPR91 в печени может быть связана с тем, что рецептор индуцируется в этом органе только в звездчатых клетках и не идентифицируется в большинстве других клеток.

Таким образом, индуцируемая в ответ на однократное воздействие ГБГ срочная экспрессия GPR91 тканеспецифична, зависит от силы и длительности гипоксического воздействия и по интенсивности не коррелирует с базовым уровнем рецептора. Так в миокарде базовый уровень GPR91 был самым высоким. Однако интенсивность его экспрессии при ГБГ слабой и средней тяжести была невелика и нарастала медленно.

В КГМ базовый уровень GPR91 был в 2 раза меньше, чем в миокарде. Тем не менее его экспрессия индуцировалась в более широком диапазоне низких концентраций O₂ во вдыхаемом воздухе, нежели в миокарде и печени, и отличалась высокой интенсивностью. Все это говорит о более высокой реактивности и чувствительности к дефициту кислорода этой сукцинат-зависимой сигнальной системы в КГМ сравнительно с другими исследованными органами, что может отражать ее особую значимость для мозга в условиях гипоксии. Кроме того, механизмы формирования срочной экспрессии GPR91 в этих тканях, видимо, различаются. Из полученных нами данных следует также, что срочная гипоксическая экспрессия GPR91 в КГМ достигала максимальных значений примерно через 45-60 минут после начала гипоксического воздействия, что совпадало по времени с периодом формирования срочной резистентности организма к гипоксии. Сразу после прекращения первого часового воздействия ГБГ в КГМ началось медленное снижение уровня GPR91 и постепенное его возвращение к базовым значениям, которое завершалось ко вторым-третьим суткам. Эффект может быть связан с интернализацией рецептора, что подтверждается данными гисто-цитохимического анализа. Изменений уровня GPR91 в последующие 2 недели после однократного гипоксического воздействия не происходило.

В отличие от однократной одночасовой гипоксии, при *многократном применении* часовых воздействий ГБГ (10,5% O₂, гипоксия средней тяжести) во всех исследованных тканях, независимо от того, формировалась срочная фаза экспрессии рецептора или нет, после 5-8 сеансов развивалась фаза отсроченной экспрессии GPR91, которая была максимально выражена в период 8-12 суток. Она совпадала с периодом формирования отсроченной неспецифической толерантности организма (Кирова, 2016). В КГМ при данном режиме ГБГ интенсивность отсроченной экспрессии GPR91 была одинаковой как у НУ, так и ВУ животных. В миокарде и печени ВУ крыс она была выражена гораздо слабее, чем у НУ. Ни в одной из исследованных тканей фаза отсроченной экспрессии GPR91 не формировалась после однократного гипоксического воздействия. Следовательно, для ее проявления были необходимы повторные сеансы ГБГ. Это свидетельствует о том, что механизм ее образования не зависел от фазы срочной экспрессии GPR91 и был опосредован другими процессами, развивающимися в более поздний период.

Таким образом, сукцинат-зависимый рецептор GPR91 вовлекается в механизм формирования как срочной, так и отсроченной адаптации к гипоксии, что предполагает особую значимость этого сигнального пути для функционирования мозга. Характерная для КГМ как нормоксическая, так и гипоксическая экспрессия GPR91 сукцинат-зависима и отражает сопутствующее гипоксическому воздействию локальное увеличение содержания сукцината в ткани в результате репрограммирования работы дыхательной цепи с последующим его связыванием с рецептором по типу паракринного сигнала (Лукьянова и др., 2015; Lukyanova, Kirova, 2015).

Кроме этого пути в мозге источником сукцината может быть ГАМК-шунт, активирующийся при гипоксии, и сопряженное образование сукцината в глутаматдекарбоксилазной реакции, а также трансаминазные реакции. Проверка возможности использования сукцината, образуемого в этом цикле в КГМ, в качестве специфического лиганда рецептора GPR91 показала, что при подавлении активности глутаматдекарбоксилазы – фермента, ответственного за синтез ГАМК, ее ингибитором – тиосемикарбазидом, срочная экспрессия GPR91 в условиях гипоксии средней тяжести в КГМ не индуцировалась. Однако если тиосемикарбазид был введен вместе с сукцинат-содержащими препаратами (проксипин, мексидол, сукцинат натрия), экспрессия рецептора в ткани восстанавливалась и была лишь незначительно снижена по сравнению с теми значениями, которые были получены без ингибитора ГАМК. Эти результаты свидетельствуют о зависимости экспрессии GPR91 в КГМ от сукцината, образующегося в индуцированных ГБГ реакциях ГАМК-шунта (рис. 24). Последнее, в свою очередь, позволяет предполагать, что индукция сукцинат-зависимого рецептора GPR91 в КГМ при гипоксии выполняет специфическую роль, связанную с работой этого шунта и направленную на устранение глутаматной эксайтотоксичности, а также на поддержание в этих условиях сукцинатаксональной активности (МФК-II) (рис. 25) (Лукьянова и др., 2015; Lukyanova, Kirova, 2015).

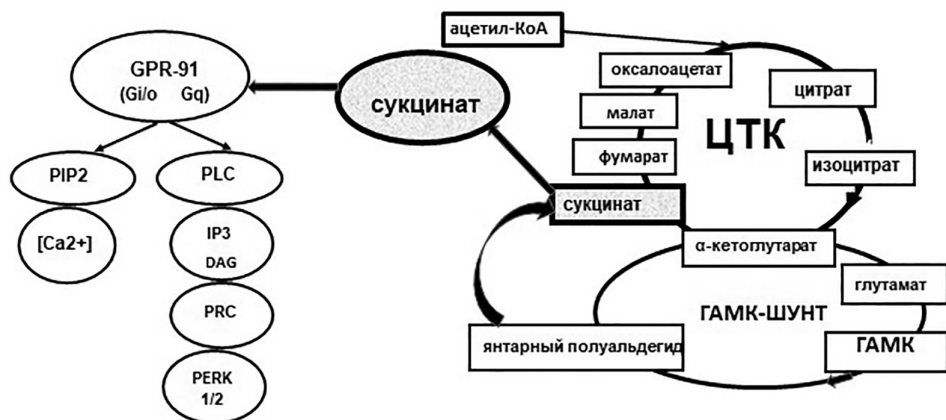


Рисунок 25 – ГАМК-шунт – поставщик **сукцината** для ЦТК и каскада реакций, связанных с GPR91

Таким образом, все эти результаты свидетельствуют о том, что:

1) Сукцинат-зависимый рецептор GPR91 в нормоксических условиях идентифицируется только в аэробных тканях, имеющих митохондрии. Его распределение в организме тканеспецифично. Наибольшее его количество выявлено в миокарде, где он более чем в два раза превышает содержание GPR91 в других тканях, в том числе и в КГМ, и в печени, и играет, по-видимому, особую роль в этом органе именно в нормоксических, а не гипоксических условиях.

2) Срочная и отсроченная гипоксическая экспрессия GPR91 индуцируются более всего в КГМ. Обе фазы зависят от силы и длительности гипоксического воздействия и не коррелируют с базовым уровнем рецептора. Срочная гипоксическая экспрессия GPR91 максимально выявляется в КГМ, где она идентифицируется уже через 15 минут после начала воздействия и характеризуется более низким порогом чувствительности к O_2 во вдыхаемом воздухе, нежели в миокарде и печени, что отражает более высокую чувствительность этой системы в мозге к дефициту кислорода.

3) Срочная экспрессия GPR91 при гипоксии, специфичная для КГМ, связана с активностью ГАМК-шунта, являющегося в этих условиях одним из источников сукцината как для рецептора, так и для дыхательной цепи и вовлечена в механизм устранения глутаматной эксайтотоксичности (Рис. 24).

GPR91 может взаимодействовать с различными G-белками. Как уже отмечалось, GPR91 может активировать как Gi-, так и Gq-белки, запустив различные сигнальные пути и обуславливая различные клеточные эффекты. Например, в культурах клеток почек (HEK293 и MDCK) сукцинатный рецептор вызывает внутриклеточное высвобождение кальция, образование инозитолтрифосфата, активирует внеклеточную сигнал-регулируемую киназу 1/2 (ERK 1/2) и снижает концентрацию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Этот путь, сопряженный с активацией Gi- или Gq-, зависит только от концентрации сукцината

(He et al., 2004). В гемопоэтических стволовых клетках сигнал опосредуется исключительно Gi/o – белками и ведет к пролиферации клеток за счет активации ERK 1/2 (Hakak et al., 2009). Однако в кардиомиоцитах сукцинат увеличивает, а не снижает содержание цАМФ, что приводит к активации протеинкиназы A (PKA) и свидетельствует о том, что GPR91 может также взаимодействовать с Gs – белком (Aguiar et al., 2014).

Наличие множественных внутриклеточных сигнальных путей, активируемых GPR91, говорит о том, что его эффекты чрезвычайно разнообразны. Тем не менее именно многопрофильность действия GPR91 не позволяет на сегодняшний день сформулировать его регуляторную значимость в клеточном сигналинге. Очевидно, что он может индуцировать продукцию целого ряда ангиогенных факторов, в том числе, HIF-1 – независимую экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) (Caprara et al., 2011; Hu, 2013; Sapieha, 2012; Sapieha et al., 2008), а также экспрессию ангиопоэтина 1, ангиопоэтина 2 и ангиогенных провоспалительных медиаторов – интерлейкина-1 β и интерлейкина-6 (Hamel et al., 2014; Naldini, Carraro, 2005). Все это указывает на вовлечение GPR91 в адаптивные процессы. При этом установлено, что GPR91 регулирует экспрессию VEGF и пролиферацию клеток эндотелия, активируя сигнальные пути ERK1/2 и JNK с последующей апрегуляцией экспрессии циклооксигеназы-2 (COX-2) и простагландина E2 (PGE2). Поскольку ген COX-2 кодирует содержащийся в цитозоле белок, продукция которого увеличивается при воспалении и который может способствовать возникновению локальной ишемии и гипоксии, повышенный уровень экспрессии COX-2 позволяет предполагать, что воспаление играет важную роль в возникновении и развитии диабетической ретинопатии (Hu et al., 2015).

При изучении влияния *гипоксического воздействия* на взаимодействие VEGF и GPR91 установлено, что в случае *однократного* его применения наиболее эффективным режимом, индуцирующим экспрессию VEGF во всех исследованных органах НУ и ВУ крыс, является ГБГ₅₀₀₀ (10,5% O₂). В этих условиях увеличение экспрессии GPR91 *предшествует* индукции VEGF и *положительно коррелирует с динамикой экспрессии VEGF на протяжении всего гипоксического периода* (Lukyanova, Kirova, 2015). Все это говорит о возможности сопряжения гипоксической индукции VEGF и динамики плотности GPR91 при однократном воздействии ГБГ средней тяжести (Кирова, 2016).

При *многократных* гипоксических воздействиях изменения плотности GPR91 происходят в гораздо более широком диапазоне концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе, нежели экспрессия VEGF. Оптимальными условиями для накопления этого фактора также является режим ГБГ₅₀₀₀ (10,5% O₂). Только в этом случае наблюдается корреляция между динамикой VEGF и GPR91, как и при однократном применении гипоксии. Индукция VEGF отсутствует как при более высоких значениях O₂, так и при более низких (тяжелая гипоксия), способствующих развитию повреждающих эффектов. Гипоксическая экспрессия VEGF выявляется всегда позже, чем происходит увеличение уровня GPR91 (Кирова, 2016).

Таким образом, гипоксическая индукция GPR91 связана с индукцией VEGF в КГМ НУ и ВУ крыс в *ограниченном диапазоне умеренно сниженных концентраций O₂* во вдыхаемом воздухе (10,5% O₂). Она наиболее выра-

жена в КГМ и является HIF-зависимой у НУ животных и HIF-независимой у ВУ. Однако она положительно коррелирует с гипоксической экспрессией GPR91 в КГМ обоих фенотипов крыс.

При изучении механизмов, контролирующих срочную гипоксическую индукцию GPR91, доказано, что в условиях *in vivo* она действительно сукцинатзависима как в нормоксических, так и в гипоксических условиях. В последнем случае главным источником сукцината для GPR91 в КГМ является ГАМК-шунт (цикл Робертса), активирующийся при гипоксии, и сопряженное образование сукцината в глутаматдекарбоксилазной реакции, а также трансаминазные реакции.

Резюмируя данные, свидетельствующие о принципиальных фенотипических различиях в механизме индукции GPR91 и сопряженных процессов, следует подчеркнуть, что для КГМ НУ крыс сравнительно с ВУ характерны:

- более низкий базовый уровень сукцината, СДГ и плотности GPR91;
- более выраженное увеличение содержания сукцината при гипоксии, коррелирующее с более интенсивным увеличением плотности GPR91;
- более низкая базовая интегральная оптическая плотность GPR91-экспрессирующих клеток;
- более выраженная зависимость гипоксической индукции GPR91 от активности ГАМК-шунта;
- более выраженная зависимость гипоксической индукции GPR91 от адренергической регуляции.

Следует также обратить внимание на то, что длительное увеличение экспрессии GPR91 может иметь негативные последствия (Фонсека и др, 2017). Так, например, длительное повышение уровня циркулирующего в крови сукцината, сопряженное с активацией GPR91, может вызывать гипертрофию миокарда (Aguilar et al., 2014). Высокая плотность GPR91 усиливает реакцию отторжения трансплантата (Rubic et al., 2008) и способствует активации фиброгенных реакций (Li et al., 2015).

Все это говорит о важности продолжения исследований роли рецептора в жизнедеятельности организма.

Кроме того, появляется перспектива поиска препаратов – антагонистов GPR91, которые могут быть использованы в медицинских целях, например, для модуляции VEGF (Оковитый и др., 2015; Шустов, Оковитый, 2015; Фонсека и др., 2017).

5.2.4 Гормонально-рецепторный контроль энергетического обмена при гипоксии

Согласно современным представлениям, существует тесное взаимодействие между энергетическим обменом, гормональным статусом и рецепторной системой клетки, которое может нарушаться при гипоксии. Действительно, снижение содержания АТФ при гипоксии нарушает прежде всего энергозависимый процесс фосфорилирования-дефосфорилирования мембранных белков и липидов, который обеспечивает структурную целостность мембран. Это способствует активации эндогенных фосфолипаз и нерегули-

руемой их атаки плазматической мембраны, распаду и потере мембранных фосфолипидов, увеличению текучести мембраны и их селективной проницаемости. Благодаря этому происходит утечка из клетки K^+ и некоторых цитозольных ферментов и насыщение в нее Ca^{2+} , а также падение мембранного потенциала. Все это должно влиять и на структурно-конформационное состояние рецепторов и их функцию (Кондрашова, 1976, 1989, 1991, 2000, 2002а,б; Кондрашова и др., 2002; Хундерякова и др., 2008). Однако существуют и более прямые связи между рецепторным аппаратом и энергетическим обменом.

В 1985 г. была выдвинута гипотеза о гормонально-субстратно-нуклеотидных системах. Согласно ей, существует функциональный блок: катехоламины – янтарная кислота-цАМФ с положительными обратными связями, где окисление сукцината контролируется катехоламинами и наоборот сукцинат (в микромолярных концентрациях) может стимулировать метаболизм катехоламинов (сигнальное действие, реализующееся через рецепторы) (Кондрашова, 2000, 2002 а, б; Kondrashova, Doliba, 1989). Это взаимодействие обеспечивает связь между вегетативной нервной системой (ее симпатическим отделом) и процессами окисления в митохондриях иннервируемых органов. Усиление окисления янтарной кислоты катехоламинами включает активацию более быстрых путей образования сукцината, чем полный цикл Кребса. Существует сигнальная связь и между метаболизмом митохондрий и парасимпатическим отделом нервной системы через взаимодействие α -кетоглутарата и ацетилхолина. Такие взаимодействия рассматриваются как новая регуляторная физиологическая система – *субстратно-гормональная*. Таким образом, СДГ является ферментом, через который в митохондриях «замыкается» взаимодействие субстратно-гормональных партнеров: янтарная кислота–катехоламины

Таким образом, в настоящее время можно говорить об общей концепции регуляции функций митохондрий, как и клетки в целом, не только макроэнергетическими соединениями, коферментами и метаболитами, но и гормонами и вторыми посредниками. Изучение этих модулирующих взаимоотношений при гипоксии приобретает особое значение. Рецепторные системы и нейромедиаторы могут отвечать за включение компенсаторных метаболических реакций при гипоксии, модулирующих и контролирующих энергетический обмен.

Косвенное подтверждение такой зависимости получено при изучении влияния агонистов и антагонистов различных рецепторов на электрогенную функцию нейронов в условиях гипоксии. Например, ацетилхолин оказывает достоверное защитное действие на импульсную активность нейронов при низких pO_2 и в период постгипоксического восстановления, которое снимается атропином. Это указывает на участие М-холинорецепторов в формировании резистентности энергозависимой реакции нервных клеток на гипоксию. Участие бета-адренорецепторов в переключении метаболических потоков дыхательной цепи также было показано на кардиоцитах.

В условиях гипоксии эта модуляция приводила к антигипоксическому эффекту. Антигипоксические эффекты показаны и для производных ГАМК, активирующих ГАМК-рецепторы, транквилизаторов бензодиазепинового ряда, возбуждающих аминокислот, связанных с глутаматными рецепторами. Антигипоксическим действием обладают многие психофармакологические вещества, в том числе нейролептики, например,

локсапин – антагонист дофаминергических рецепторов; антидепрессанты виллоксазин и адрепен, повышающие концентрацию катехоламинов и активирующие сукцинатдегидрогеназу.

Адениннуклеотиды и гуаниннуклеотиды не только занимают ключевые позиции в регуляции энергосинтезирующих и энергопотребляющих процессов в клетке, ее обмена в целом, но и выполняют медиаторную роль через два типа пуринергических рецепторов. Для P_1 -пуринергических, цАМФ-зависимых рецепторов агонистами являются аденозин и АМФ. Активация P_2 -пуринергических, цАМФ-независимых рецепторов, посредником которых является мио-инозитол 1,4,5-фосфат, происходит под влиянием АТФ и АДФ и приводит к усилению простагландинового синтеза. Таким образом, в обоих случаях имеет место усиление Са-обмена. Пуриновые нуклеотиды являются также модуляторами гормонов и нейромедиаторов, повышая или снижая их сродство к соответствующим рецепторам (адренергическим, холинергическим, мускариновым, гистаминовым, серотониновым и пр.). Они могут также менять чувствительность к глюкагону и АКТГ. Именно эти регуляторные качества определяют, по-видимому, сильные антигипоксические свойства АТФ и аденозина, обладающих к тому же вазодилаторными эффектами. В отношении последнего известно также, что помимо своего сосудорасширяющего эффекта, он является блокатором кальциевых каналов и в условиях гипоксии подавляет высвобождение катехоламинов.

Таким образом, открывается еще одна область фармакологических исследований – установление роли центральных и периферических нейромедиаторов в формировании особенностей энергетического обмена при гипоксии, специфического значения пуриновых нуклеотидов в этом процессе, поиск и создание антигипоксических средств, модулирующих функцию рецепторов при гипоксии и обладающих энергизирующим действием. Особая роль при этом принадлежит веществам, взаимодействующим с пуриновыми рецепторами, либо их мессенджерами.

Глава VI ЭНЕРГОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДИСФУНКЦИЙ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ, ВКЛЮЧАЮЩИХ ГИПОКСИЧЕСКУЮ КОМПОНЕНТУ (МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ)

6.1 История вопроса

Проблема фармакологической коррекции гипоксических состояний возникла в середине XX века и является приоритетной для нашей страны. История ее возникновения связана с ленинградской школой фармакологов (Виноградов, 1978, 1984; Денисенко, 1986, 1988; Лосев Н.И., 1987; Пастушенков Л.В., 1969; Пастушенков, Лесиовская, 1991; Урюпов, 1985). Именно этой школой в начале 60-х годов XX века был введен термин *антигипоксанты* как средства защиты от гипоксических воздействий (Арбузов, Пастушенков, 1969). Свой профиль школа сохранила до настоящего времени. В Санкт-Петербурге на протяжении всего последующего периода активно велся и ведется поиск антигипоксических средств (Александрова, Смирнов и др., 1992; Евсеева и др., 2008; Зарубина, Шабанов, 2003; Новиков и др., 1998; Оковитый и др., 2012, 2015; Селиванов, Криворучко, 2001; Селиванов и др., 2012).

Следует отметить, что в фармакологии традиционным является классификация лекарственных средств по их корригирующему действию на специфические для данной патологии нозологические признаки. Однако в случае гипоксии это невозможно, так как она является типовым патологическим процессом (см. раздел 3.6), не имеющим этиологической и нозологической специфичности. При этом следует иметь в виду, что аппарат аэробного синтеза энергии (митохондрии) имеется в подавляющем большинстве клеток млекопитающих, и организация энергосинтезирующих процессов в них построена по одному принципу. Биоэнергетические нарушения при гипоксии в разных тканях и органах развиваются по сходному механизму, хотя имеются тканеспецифические и индивидуальные различия, отражающие чувствительность органа к дефициту кислорода. В то же время клетки разных органов и тканей отличаются набором характерных для них специфических энергопотребляющих процессов. В нейронах – это электрогенная функция; в миоцитах и кардиомиоцитах – сократительная функция; в печени – синтетические энергозависимые процессы; в почках – секреторная функция и пр. В силу этого один и тот же механизм нарушения энергетического обмена в разных клетках приводят к подавлению чрезвычайно широкого спектра энергозависимых функций, которые и определяют *полиорганную недостаточность* и *мультифункциональные повреждения* при гипоксии. Восстанавливая работу этого одного звена – молекулярной мишени, – мы устраняем одновременно и весь комплекс сопряженных функциональных нарушений. Именно поэтому энерготропные препараты характеризуются очень широким спектром положительного влияния на функциональную активность организма.

Отсутствие возможности использовать нозологические признаки для разных форм гипоксии очень мешало обоснованию применения антигипоксических средств в качестве самостоятельного класса фармакологических препаратов. В ранних работах, посвященных поиску антигипоксантов, их отбор проводился преимущественно по физиологическим показаниям, отражающим нарушение различных функций. В связи с этим при попытке классифицировать антигипоксанты в этот период были выделены четыре группы веществ (Андрианова, Сидорова, 1974): а) препараты, улучшающие доставку кислорода к тканям; б) вещества, нормализующие обмен веществ при гипоксии; в) средства, снижающие потребности организма к кислороду; г) препараты из различных фармакологических групп.

Как видим, только первая группа была определена достаточно конкретно. Определение свойств второй группы было очень расплывчатым, так как совершенно неясно, о каком обмене или его звене идет речь. Спорным является мнение о том, что проявлению антигипоксических эффектов должно обязательно сопутствовать снижение уровня основного обмена. Последнее, действительно, на фоне умеренной гипотермии приводит к уменьшению энергетических запросов, что способствует ослаблению развития энергодефицита в клетке в условиях кислородной недостаточности. По такому механизму действуют, например, блокаторы бета-адренорецепторов в миокарде, и это может лежать в основе их антигипоксического эффекта. Однако позже стало очевидным, что защитное действие многих антигипоксантов сопровождается увеличением скорости окисления энергетических субстратов, связанных с активацией компенсаторных метаболических потоков, т.е. с усилением аэробного обмена.

Наконец, последняя группа объединяла вещества, по механизму действия, о которых тогда было абсолютно ничего не известно.

В 1976 г. в монографии, посвященной антигипоксантам (Кораблев, Лукиенко, 1976), ее авторы в результате тщательного анализа литературы представили огромный список веществ с антигипоксическими свойствами. При этом они исходили уже из представлений о том, что гипоксия – фазный процесс, и в силу этого действие антигипоксантов может быть неодинаковым на разных стадиях патологического процесса, а главной точкой приложения фармакологической защиты должен быть энергетический обмен. Отсутствие, однако, в тот период знаний о механизмах биоэнергетических нарушений при гипоксии не позволило авторам предложить научно-обоснованную тактику и стратегию их применения.

Достижения фундаментальных исследований позволили В.М. Виноградову и О.Ю. Урюпову (1985) отказаться от деления антигипоксантов по признакам системных нарушений. Уже тогда авторы сумели понять, что концепция развития фармакологии этой группы возможна только при их разделении по первичным механизмам действия на уровне клетки. В связи с этим они выделили только две группы антигипоксантов: 1) улучшающих транспортную функцию крови и 2) защищающих энергетический статус клетки при гипоксии. При этом авторы исходили из представлений, что причиной инактивации аэробных окислительных процессов в условиях дефицита кислорода являются нарушения функции ЦХО.

В силу этого одной из наиболее перспективных групп антигипоксантов они считали активаторы гликолиза как основного адаптационно-компенсаторного

процесса, обеспечивающего поддержание энергетического статуса клетки при гипоксии. В свете современных знаний трудно, однако, согласиться с этим мнением авторов. Это справедливо, по-видимому, только для скелетных мышц. В таких же высоко-аэробных тканях – мишенях для гипоксии, как сердце, мозг, печень гликолиз не может обеспечить поддержание необходимого уровня внутриклеточного АТФ, что и было показано на примере гепатоцитов (Дудченко, 2003). Более того, известно, что гликолиз приводит к усилению внутриклеточного ацидоза, а также к снижению содержания цАМФ, аденозина, простагландинов, что создает предпосылки для дестабилизации и разрегулирования рецепторной функции клетки в этих условиях. Поэтому усиление гликолиза имеет положительное значение, видимо, лишь при условии сохранения достаточно высокой активности аэробного окисления, а также в некоторых специальных случаях.

В середине 80-х прошлого века была уже сформулирована ведущая регуляторная роль митохондриальной дыхательной цепи в формировании ответной реакции на гипоксию. Было доказано, что любая форма кислородной недостаточности сопровождается развитием так называемой «биоэнергетической гипоксии» (Лукьянова, 1981, 1988, 1989 а, б, 1991, 1997, 1999), в основе которой лежат фазные изменения активности митохондриальных ферментных комплексов, что и приводит к постепенно нарастающему энергодифициту и в конечном счете – к нарушениям специфической функции клеток.

Как известно, изменения электрон-транспортной функции дыхательной цепи в ответ на гипоксические воздействия начинаются на субстратном (НАДН-зависимом) ее участке и распространяются при увеличении длительности или тяжести гипоксического воздействия вначале на область цитохромов *b-c*, а затем на цитохромоксидазу. Последняя не является, как считалось раньше, лимитирующим звеном этого процесса в широком диапазоне значений pO_2 вплоть до аноксической области. В силу этого при решении вопроса о защите организма от кислородной недостаточности на первый план выступает проблема восстановления активности различных митохондриальных ферментных комплексов – мишеней фармакологического антигипоксического воздействия, и устранения таким образом или предупреждения развития биоэнергетической гипоксии, которая является триггером в каскаде других гипоксических метаболических нарушений.

Эта важнейшая практическая задача определила *формирование тактики и стратегии антигипоксической защиты молекулярных мишеней гипоксии и создания антигипоксических средств энерготропного действия*. Все это, в свою очередь, легло в основу еще одного нового направления – **«митохондриальной фармакологии»**.

Различают антигипоксиканты **прямого (специфического) и непрямого (неспецифического) энергизирующего (энерготропного) действия**.

К антигипоксикантам **прямого энергизирующего действия или энерготропным препаратам** относятся вещества, которые в условиях нормоксии существенно не влияют на физиологические и метаболические параметры в дозах, обеспечивающих проявление антигипоксического эффекта в условиях дефицита кислорода. Их действие направлено непосредственно на коррекцию нарушений функции дыхательной цепи при гипоксии, на восстановление активности различных ее ферментных комплексов (Лукьянова, 1981-2005).

Понятие «**энерготропная терапия**» подразумевает использование в качестве лекарственных средств веществ, способных взаимодействовать с митохондриальной дыхательной цепью и предупреждать в условиях патологии нарушения энергетического обмена вплоть до его полного восстановления. При этом их антигипоксическая активность преобладает в общем спектре их фармакологического действия и выражается преимущественно в прямом корректирующем действии на энергетический обмен (Лукиянова, 1991).

К антигипоксантам **непрямого** действия относятся вещества, которые в качестве основной имеют фармакологическую активность, не связанную с антигипоксическим действием, либо защитное действие которых при гипоксии направлено на коррекцию функционально-метаболических систем, лишь вторично приводящих к гипоксическим нарушениям. Круг таких веществ очень широк. К ним относятся ряд ноотропов, производные возбуждающих аминокислот, амтизол и др.

6.2 Энерготропные препараты, способствующие формированию шунтирующих МФК I путей окисления

В настоящее время известны три основных фармакологических подхода, которые лежат в основе срочной энерготропной терапии при гипоксии (Лукиянова Л.Д., 2000–2005):

1) активация альтернативного основной дыхательной цепи **сукцинатоксидазного** пути окисления, шунтирующего МФК I (рис. 26):

Сукцинат → МФК II → CoQ → МФК III → МФК IV;

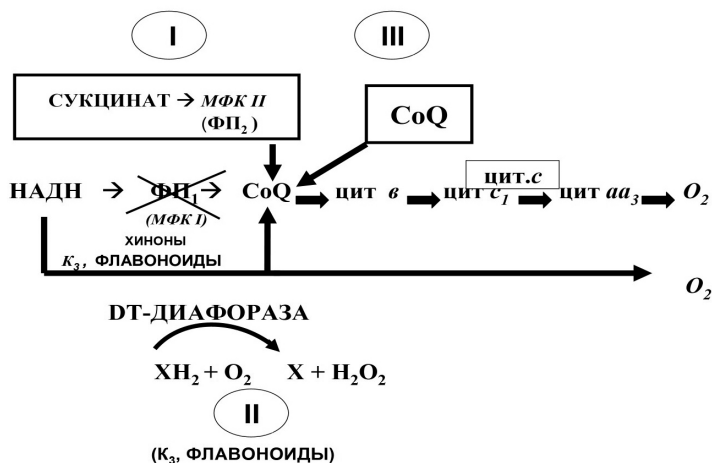


Рисунок 26 – Схема действия энерготропных препаратов на различные участки дыхательной цепи

I – сукцинатоксидазный путь окисления, шунтирующий МФК I;

II – DT-диафоразный путь окисления, шунтирующий МФК I в присутствии веществ витамин-K₃-подобного действия;

III – предполагаемый путь окисления экзогенного CoQ;

ФП – флавопротенды; цит – цитохром

- 2) активация альтернативного основной дыхательной цепи *ДТ-диафоразного* (ДТ-Д) пути окисления, шунтирующего МФК I:
 $\text{НАДН (НАД(Ф)Н)} \rightarrow \text{ДТ-Д} \rightarrow \text{CoQ} \rightarrow \text{МФК III} \rightarrow \text{МФК IV}$;
3) коррекция транспорта электронов на *цитохромном* участке
 $\text{CoQ} \rightarrow \text{МФК III} \rightarrow \text{МФК IV}$; $\text{цит } c \rightarrow \text{МФК IV}$.

6.2.1 Активация сукцинатоксидазного окисления за счет эндогенных источников сукцината

Возможные пути образования сукцината (янтарной кислоты) в условиях *in vivo* при гипоксии была подробно проанализирована в 70-е годы прошлого столетия Кондрашовой М.Н. и сотрудниками (см. раздел 3.5.3). Ими было показано, что эндогенное образование сукцината может происходить в самых различных реакциях: в реакциях переаминирования, связанных с активацией при гипоксии (ишемии) так называемого быстрого кластера ЦТК, при карбоксилировании пирувата и фосфоенолпирувата, при обращении малатдегидрогеназной реакции, при активации цикла Робертса или ГАМК-шунта (Кондрашова М.Н. 1971, 1972, 1976, 1989; Кондрашова, Маевский, 1978; Кондрашова и др., 1973, 1974, 1996, 2002; Маевский, 2000; Маевский и др., 1996, 2000, 2001а, б). Фармакологам хорошо известна роль последнего, являющегося важнейшим компенсаторным механизмом энергопродукции, который активируется в мозге при гипоксии, и путем последовательного окисления глутамата в ГАМК, полуянтарный полуальдегид и янтарную кислоту, обеспечивает дополнительную поставку сукцината ЦТК и в дыхательную цепь, шунтируя таким образом цикл Кребса на участке между α -кетоглутаровой кислотой и сукцинатом (см. рис. 24). Усиление этого пути происходит и при окисления известного антигипоксанта – натрия оксibuтирата (ГОМК).

Активация при ишемии в присутствии ГОМК сукцинатоксидазного окисления в митохондриях мозга через янтарный полуальдегид с одновременным конкурентным подавлением окисления пирувата доказана экспериментально. При этом ГОМК снижает внутриклеточную концентрацию НАДН, уменьшая тем самым при гипоксии дефицит окисленных форм НАД. Одновременно препарат обладает выраженным антиишемическим действием: у животных на его фоне в условиях циркуляторной ишемии мозга не развиваются признаки энергетической декомпенсации, снимается судорожная активность, отсутствует переход к дезадаптации. ГОМК хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер. В силу всех этих свойств ГОМК в определенное время рассматривался как эталонный препарат-антигипоксанта.

Интенсификация путей образования сукцината при гипоксии может происходить в различных реакциях переаминирования, связанных с активацией при гипоксии (ишемии) так называемого *быстрого кластера ЦТК* (Кондрашова, 1989, 1991). Лимитирующими звеньями этого быстрого цикла являются дефицит витаминов B_1 , B_6 , липоевой кислоты, рибофлавина – кофермента СДГ. Все эти вещества являются сильными антигипоксантами. Витамин B_6 катализирует также шунт ГАМК.

Сукцинат может синтезироваться даже в гипоксических или преданоксических условиях (восстановительное обращение цикла Кребса от оксалоацетата или малата до сукцината; сопряженное течение восстановительного обращения и окислительных реакций цикла Кребса; анаэробная дисмутация альфа-кетоглутарата в присутствии аммония по Кребсу-Коэну, когда одна молекула альфа-кетоглутарата используется для восстановительного аминирования в глутамат с одновременным окислением восстановленных пиридиннуклеотидов, что поддерживает окисление другой молекулы альфа-кетоглутарата до сукцината; взаимосвязь гликолиза и анаэробного образования сукцината через малат-аспартатный шунт, переносящий восстановительные эквиваленты из цитозоля в митохондрии (Маевский и др., 2017).

Скорость окисления эндогенно образованного сукцината существенно превышает скорость окисления НАД-зависимых субстратов и экзогенно введенных препаратов сукцината. Эндогенный сукцинат способствует ускорению утилизации избытка лактата и глюкозы, улучшению энергетического статуса ткани и уменьшению ацидоза.

6.2.2 Применение экзогенных солей сукцината для активации при гипоксии сукцинатаоксидазного окисления

Данные о возможности снизить или ликвидировать энергетический дефицит в условиях гипоксии и сопутствующего прироста степени восстановленности внутриклеточного НАДН (как в цитозоле, так и в митохондриях) с помощью экзогенного сукцината, который, в отличие от НАД-зависимых субстратов, способен окисляться в этих условиях и воспроизводить при гипоксии АТФ в реакциях ОФ, легли в основу разработки *тактики и стратегии фармакологической коррекции гипоксических состояний* (сукцинатотерапии). Огромный вклад в обоснование правомочности применения экзогенного сукцината для защиты организма при гипоксии был сделан Кондрашовой М.Н. и ее школой (Кондрашова М.Н., 1976–2005; Маевский Е.И., 2001 и др.). Первые положительные антигипоксические эффекты были получены при применении солей янтарной кислоты (*сукцината натрия, сукцината аммония (препарат Энерлит)*). В качестве источников экзогенного сукцината использовались также пищевые добавки на основе янтарной кислоты (*янтавит, митомин, энерлит, лимонтар* – смесь сукцината натрия и лимонной кислоты).

Соли янтарной кислоты дополнительно к энерготропному эффекту обладают антиоксидантным, антиацидотическим, антитератогенным, антиоксическим, гепатопротекторным, антикетогенным действием. Они модифицируют фосфолипиды, способствуя их ресинтезу; уменьшают ионную проницаемость мембран; нормируют обмен кальция и калия. Роль сукцината в качестве антиоксиданта соизмерима с эффектом синтетического антиоксиданта ионола.

При этом был снят вопрос о плохой проницаемости сукцината через клеточные мембраны. Изотопный анализ превращений сукцината в организме показал, что введенный *per os* сукцинат быстро проникает из желудка в кровь и ткани и через 30 минут до 16% препарата аккумулируется в различных органах (скелетные мышцы > печень > плазма кровь > почки).

Скорость проникновения сукцината в интактные ткани и включения его в метаболические превращения выше, нежели у экзогенной глюкозы. Тяжелая физическая нагрузка, сопровождающаяся рабочей гипоксией, усиливает этот процесс. Являясь одним из конечных продуктов окислительно-восстановительных реакций, экзогенный сукцинат не метаболизируется в желудке (Hochachka, Dressendorfer, 1976; Hochachka, 1986; Hochachka et al., 1996), но участвует в окислительных реакциях энергетического обмена, так как окисляется до CO_2 и выводится с выдыхаемым воздухом (Маевский и др., 1989, 1996, 2001). Все это подтверждает оправданность применения экзогенного сукцината в качестве таргетного энерготропного препарата для поддержания работы дыхательной цепи в гипоксических условиях.

Еще один подход создания энерготропных препаратов – изготовление смесей, содержащих сукцинат и метаболические добавки, которые теоретически, по мнению создателей препаратов, должны были бы усиливать их защитный эффект в условиях гипоксии (фирма «Полисан»). Практическое применение среди них получили **реамберин** (N-метилглюкамин (меглюмин) натрия сукцинат) и **цитофлавин** (инозин + никотинамид + рибофлавин + янтарная кислота). К сожалению, для этой группы веществ отсутствуют экспериментальные подтверждения того, что в смесях сохраняется эффективность их действия. В то же время экспериментальная проверка антигипоксического действия **цитофлавина** показала, что в условиях умеренных гипоксических воздействий его защитные эффекты связаны главным образом с наличием сукцината в составе препарата, влияние которого ослаблялось, а не усиливалось введенными в состав смеси добавками. Цитофлавин существенно уступал также проксипину по способности формировать срочную толерантность к дефициту кислорода. Однако вполне возможно, что в условиях тяжелых гипоксических нарушений цитофлавин будет иметь преимущества перед сукцинатомонотерапией за счет входящих в его состав компонентов, обладающих способностью снизить восстановленность МФК I.

6.2.3 Применение различных синтетических органических производных сукцината

Создание новых сукцинатсодержащих гетероциклических соединений является самостоятельным направлением фармакологических исследований, достаточно успешно развиваемым в настоящее время (Лукьянова, 1989б, 1991, 1999, 2005, 2009; Оковитый и др., 2012; Смирнов и др., 2014; Шустов и др., 2013; Шахмарданова и др., 2016). Цель создания таких соединений – увеличить антигипоксическую активность и облегчить проницаемость вещества через гистогематические барьеры. Существенный интерес для этих целей представляют производные 3-оксипиридина (3-ОП). Для базового 3-оксипиридина в водном р-ре характерно наличие нейтральной (Н) и биполярной (Б) форм в соотношении 1:1. В зависимости от рН среды он может также существовать в анионной (А) и катионной (К) формах (рис. 27):

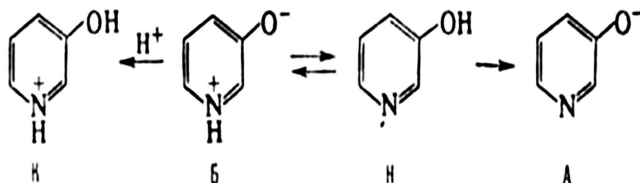


Рисунок 27 – Различные формы 3-оксипиридина

Многие представители этого класса соединений – структурные аналоги витамина В₆ – характеризующиеся широким спектром фармакологической активности, помимо выраженных антиоксидантных свойств и оригинального спектра психотропной активности обладают способностью повышать резистентность организма к различным видам гипоксического воздействия. Однако исходное, базовое основание 3-оксипиридина, не содержащее сукцинат, не обладает ни антигипоксической, ни антиоксидантной активностью.

В то же время у гидрохлорида этого соединения – **эмоксипина** (3-окси-6-метил-2-этил-пиридина гидрохлорид), также не содержащего сукцинат, но имеющего большое сходство с витамином В₆ (рис. 28), появляются умеренная антиоксидантная и слабая антигипоксическая активности (Лукьянова, 1989, 1991, 1999).

Присоединение к молекуле эмоксипина янтарной кислоты (**мексидол** - 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат) (рис. 22) придает веществу новые свойства. Мексидол был синтезирован Смирновым А.В. и Дюмаевым К.М (1982) и заявлен как антиоксидантное средство (Воронина, 2002, 2013; Воронина и др., 2000, 2002).

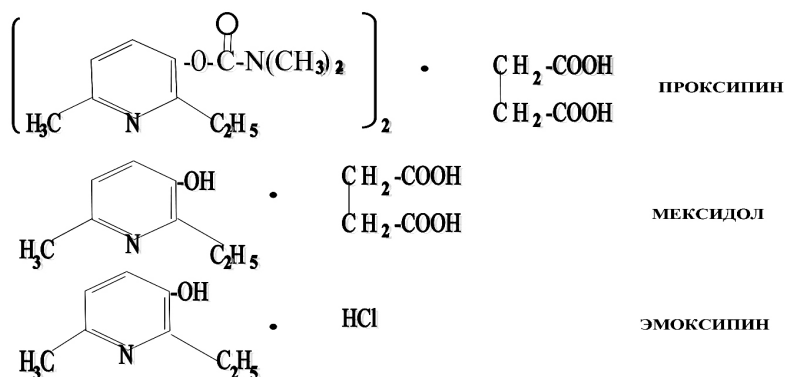


Рисунок 28 – Структурные формулы эмоксипина, мексидола, проксипина

Однако впоследствии было экспериментально доказано, что специфические антигипоксические свойства мексидола связаны с окислением янтарной кислоты в дыхательной цепи митохондрий. При этом наблюдали активацию сукцинатоксидазного окисления, эффект обратного переноса электронов, характерного для окисления янтарной кислоты, сопутствующего восстановления ПНН и ФП, а также увеличение мембранного потенциала митохондрий и содержания АТФ, которые происходят уже через 15 минут после внутривенного

введения мексидола (Лукьянова и др., 1990а, 2009; Чернобаева и др., 1990). Эти эффекты не реализуются в присутствии малоната – ингибитора сукцинатдегидрогеназы, хотя активация дыхания воспроизводится на фоне амитала – ингибитора НАДН-оксидазного пути окисления. Совместное применение мексидола и экзогенного сукцината не влияет на эти параметры, что говорит о синергизме действия и о единой точке приложения этих двух веществ в дыхательной цепи митохондрий. В то же время степень энергизации митохондрий в присутствии мексидола (но не эмоксипина) больше, нежели при окислении сукцината натрия.

Препарат снижает потери АТФ в ишемизированных мозге и миокарде (Чернобаева и др., 1990; Лукьянова и др., 1993) и нормализует процесс ОФ, что способствует восстановлению энергозависимых функций. Так в условиях нормobarической гипоксии мексидол уменьшал нарушения сократительной активности изолированного миокарда, нейрональной активности в мозге, способствовал сохранению специфических энергозависимых функций в печени (например, синтеза мочевины) (Атабаева и др., 1992; Крапивин и др., 1991; Лукьянова, 1989а, 1999; Лукьянова, Власова, 1991а; Лукьянова и др., 1990, 1992, 1993, 1997; Малышев и др., 1996; Чернобаева и др., 1990). Эффекты мексидола тканеспецифичны и сильнее выражены в тех органах, в которых потенциальная возможность для активации сукцинатаоксидазного пути выражена больше (мозг неустойчивых к гипоксии животных, миокард высокоустойчивых). Таким образом, индивидуальная резистентность животных, коррелирующая с особенностями организации работы дыхательной цепи, имеет принципиальное значение для проявления антигипоксических свойств веществ. Защитное действие мексидола сохраняется на организменном уровне при самых разных формах гипоксии.

Мексидол получил чрезвычайно широкое применение в современной клинической медицине. Показаниями к применению мексидола являются нарушения мозгового кровообращения, энцефалопатия различного генеза, вегетососудистая дистония, купирование абстинентного синдрома, острая интоксикация нейролептиками и наркотиками, коррекция гемостатических нарушений в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта (Воронина, 2001). При его введении в дозе 100-300 мг/сутки, в/м или в/в, капельно в 200 мл раствора (40-60 капель/мин) в течение 10-15 дней мексидол снижает летальность. При этом наблюдается улучшение качества жизни пациентов. У 72% пациентов наблюдается более быстрый и полный регресс общемозговой и очаговой неврологической симптоматики. У 65% пациентов происходит улучшение памяти, увеличение представленности в ЭЭГ быстрой волновой ритмики (α -диапазона), уменьшение представленности медленноволновой части спектра ЭЭГ; устранение межполушарной асимметрии. У 52% пациентов имеет место увеличение пульсового кровенаполнения, улучшение венозного оттока, нормализация тонуса мелких артерий и вен.

Положительные антигипоксические и энерготропные эффекты рассматриваемых выше производных 3-ОП стимулировали продолжение поиска новых соединений в этом ряду, что и привело к синтезу сукцинат 3-(N,N-диметил-карбамоилокси)-2-этил-6-метилпиридина, получившего вначале наименование янкарб, а затем **проксипин**. Проксипин отличается от мексидола наличием карбамоильной группировки в 3-м положении пиридинового кольца (рис. 28). При этом его энерготропное действие резко увеличено.

Введенный до подъема в барокамере на критическую высоту 11 500 м (острая гипобарическая гипоксия – ОГБГ) в существенно меньших сравнительно с мексидолом дозах он не только полностью предупреждал потерю АТФ и креатинфосфата (КФ) в КГМ НУ и ВУ крыс, но способствовал увеличению их содержания сравнительно с контрольными животными (рис. 29). При этом он многократно увеличивал толерантность организма к острой гипоксии (*антигипоксическое и адаптогенное* действие).

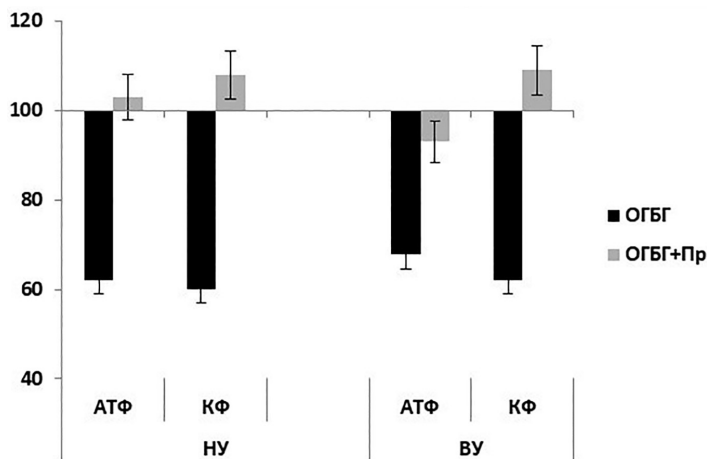


Рисунок 29 – Энерготропный эффект проксипина в условиях тяжелой гипоксии (ОГБГ). Проксипин вводили в/б, 40 мг/кг за 30 минут до подъема на критическую высоту (11 500 м – ОГБГ). Определяли содержание АТФ и КФ в КГМ крыс сразу после подъема

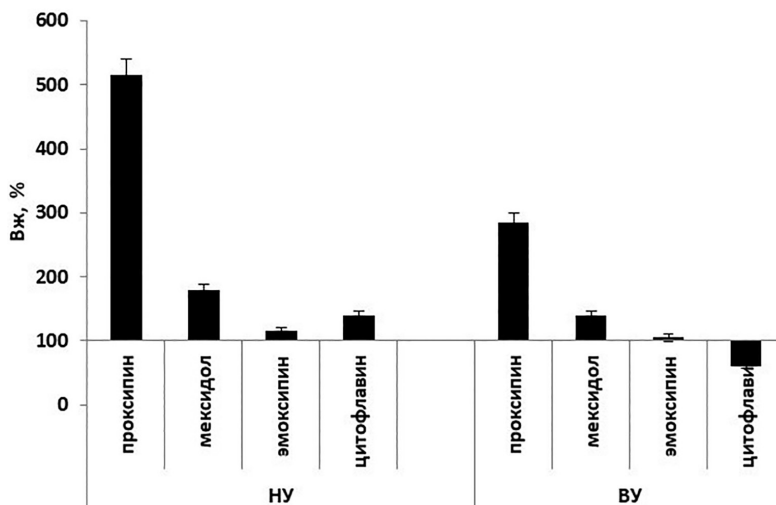


Рисунок 30 – Сравнительное антигипоксическое действие сукцинатсодержащих препаратов на резистентность крыс в условиях острой гипоксии.

Все исследуемые препараты вводили за 15 минут до подъема в барокамере. Определяли Вж животных в условиях ОГБГ.

Эмоксипин, мексидол, проксипин – производные 3-ОП. Цитофлавин – смесь сукцината, инозина, никотинамида и рибофлавина

Антигипоксические эффекты проксипина были выпажены сильнее, чем у других производных 3-ОП (мексидола и тем более эмоксипина и цитофлавина) (рис. 30), и проявлялись при его введении как до гипоксического воздействия, так и сразу после него.

Следует отметить, что сукцинатсодержащие производные 3-ОП сохраняют ряд очень ценных свойств, характерных для структуры пиридинов: они обладают способностью модулировать активность мембраносвязанных ферментов (Ca^{2+} -независимой ФДЭ, аденилатциклазы, ацетилхолинэстеразы), рецепторных комплексов (бензодиазепинового, ГАМК, ацетилхолинового), что способствует их связыванию с лигандами, сохранению структурно-функциональной организации биомембран, транспорта нейромедиаторов и улучшению синаптической передачи. Они повышают концентрацию в головном мозге дофамина.

6.2.4 Коррекция энергетического обмена при гипоксии фумарат-содержащими препаратами

В клинической практике для устранения или ослабления нарушений энергетического обмена при глубоких изменениях гипоксического и ишемического характера давно уже применяются препараты на основе природных метаболитов, в частности промежуточного продукта ЦТК – фумаровой кислоты (Алексеева и др., 1990; Андрианова, Сидорова, 1974; Андрианова и др., 1990; Маевский, Гришина, 2017; Селиванов и др., 2006, 2010; Слепнева, Хмылова, 2015; Cascarano et al., 1976; Tomitsuka et al., 2010; Wilson, Cascarano, 1970).

Фумарат натрия как легко растворимая соль фумаровой кислоты является основным компонентом таких инфузионных препаратов, как мафусол, полиоксифумарин и конфумин. Все они применяются в клинической практике при лечении разнообразных патологических состояний, требующих интенсивной терапии: при шоке различной этиологии, кровопотере, перитоните, после тяжелых оперативных вмешательств, в том числе в онкологической практике, но чаще всего в качестве противоишемических и антигипоксических средств. Эти препараты существенно уменьшают такие гипоксические симптомы, как нарушение доставки кислорода, падение энергетического статуса тканей, развитие сердечных аритмий, нарушение диуреза, появление глубокого метаболического ацидоза. После их инфузии наблюдается улучшение гемодинамики, повышение сердечного выброса, минутного объема крови и ряда показателей энергетического метаболизма, уменьшается выраженность окислительного стресса и активируется функционирование митохондрий. Мафусол, полиоксифумарин и конфумин зарекомендовали себя как высоко эффективные средства в реанимационной практике, при интенсивной терапии тяжелых септических состояниях и после обширных операционных вмешательств. Однако молекулярный механизм его действия долгое время оставался неизученным.

В аэробных условиях фумаровая кислота образуется в ЦТК в результате окисления янтарной кислоты в сукцинатдегидрогеназной реакции и далее с помощью почти равновесной фумаразной реакции превращается в яблочную кислоту (Нельсон, Кокс, 2014). Однако в анаэробных либо близких к ним условиях происходит восстановительное обращение ЦТК и реализации

NADH-фумаратредуктазной реакции с превращением оксалоацетата в малат, фумарат и завершающейся образованием сукцината (см. раздел 3.5.3), который в этих условиях имеет преимущества для окисления (Маевский, Гришина, 2017; Маевский и др., 1996).

За счет восстановительных эквивалентов, поступающих с первого комплекса дыхательной цепи, фумарат восстанавливается в НАДН-фумарат-редуктазной реакции до сукцината. Дополнительный запуск НАДН-фумаратредуктазной реакции за счет поступления внешнего фумарата важен особенно для процесса выхода из кислород-дефицитных состояний. Окисление накопленного вследствие АОС из фумарата сукцината при восстановлении нормоксических условий способствует ускорению восполнения постгипоксического энергетического дефицита, как это неоднократно было показано в эксперименте и в клинике при реанимационном использовании упоминавшихся фумарат-содержащих препаратов, а далее идут процессы, поддерживаемые аэробными превращениями фумарата.

Применение вместо свободной фумаровой кислоты ее натриевой соли способствует быстрому проникновению аниона фумарата в кровоток и в ткани, а также облегчает поддержание кислотно-основного состояния крови при развитии метаболического ацидоза.

6.2.5 DT-диафоразный шунт и энерготропные препараты витамин-К₃ подобного действия (антигипоксантаы, адаптогены)

Первый этап нарушений энергетического обмена при гипоксии – ограничение электрон-транспортной функции МФК I и НАД-зависимого окисления – способствует снижению скорости окисления субстратов цикла Кребса, их накоплению, повышению отношения лактат/пируват, развитию метаболического ацидоза. В этих условиях устранение перевосстановленности клетки – причины блока электрон-транспортной функции МФК I, может быть достигнуто не только за счет вовлечения в процесс сукцинатоксидазного окисления, но и с помощью веществ с донорно-акцепторными свойствами, имеющих более высокий окислительно-восстановительный потенциал, чем у НАД(Ф)/НАД(Ф)Н (-0,32 В) и способных шунтировать перенос электронов на участке НАДН-СoQ. К таким веществам относятся хиноны, которые имеют наиболее положительный редокс-потенциал, т.е. они являются наиболее сильными окислителями среди природных органических соединений (табл. 9) (Лукьянова, 1989, 2005, 2009).

Таблица 9 – Окислительно-восстановительные потенциалы некоторых электронакцепторных соединений

РЕДОКС-СИСТЕМЫ	E ₀ , В
$\frac{1}{2} O_2 / H_2O$	+0, 82
О-хинон/дифенол	+0, 35
1,4-бензохинон/п-гидрохинон	+0,28
Цитохром c ³⁺ /цитохром c ²⁺	+0,26
CoQ ₁₀ /CoQ ₁₀ H ₂	+0,10
Дегидроаскорбат/аскорбат	+0,08
Флавин/флавин восстановленный	-0,185
K ₂ /дигидро K ₂	-0,05

Хиноны являются субстратами широко распространенного в животном мире уникального фермента ДТ-диафоразы (НАД(Ф)Н:хинон оксидоредуктазы), взаимодействие которого с различными акцепторами электронов было открыто и изучено Эрнстером Л. (Conover, Ernster, 1962, 1963; Ernster et al., 1960; Ernster, Navazio, 1958). ДТ-диафораза – это флавопротеин (флаavin-адениндинуклеотид – ФАД), катализирующий двухэлектронную кислородзависимую редукцию хинонов или хиноидных соединений до гидрохинонов и перекиси водорода. Он играет одну из ведущих ролей в биоактивации хиноидсодержащих лекарств.

В качестве доноров электронов при этом используются НАДН и НАДФН. В условиях гипоксии при подавлении функции МФК I и при наличии специфических субстратов может происходить активация ДТ-диафоразы, индуцирующая окисление различных внутриклеточных фондов НАДН и НАДФН и формирование новых путей переноса электронов в дыхательной цепи на участке НАДН-СоQ или НАДН-цитохромы (рис. 23). Поток электронов, поступающий при этом в дыхательную цепь через СоQ, позволяет поддерживать ее сопрягающую функцию за счет активности цитохромного участка. Однако при этом происходит диссипация потоков электронов, формируются пути свободного окисления, а также происходит перераспределение концентраций метаболитов в НАД- и НАДФ-зависимых реакциях и связанных с ними системах и нормализация редокс-потенциала клетки.

Существование альтернативных основной дыхательной цепи путей переноса электронов, катализируемых различными оксидоредуктазами, шунтирующих ее свободным несопряженным окислением (внешние пути окисления), известно давно (Жигачева и др., 1977; Скулачев, 1969; Mokhova et al., 1977). К ним, помимо ДТ-диафоразы, относятся флавопротеиды: НАДФН цитохром *c*-оксидоредуктаза, локализованная в микросомальной фракции клеток печени, которая шунтирует цепь между никотинамиднуклеотидом и цитохромом *c*; НАДН-цитохром *b*₅-оксидоредуктаза, функционирующая при окислении малата, глутамата и оксibuтирата (но не других субстратов) в условиях торможения переноса электронов через цитохромы *b* и *c*₁; большая группа самоокисляющихся флавопротеидов, которые переносят водород субстрата прямо на кислород (моноаминоксидаза – фермент внешней мембраны митохондрий, а также оксидазы некоторых l- и d-аминокислот) и др. (рис. 31).

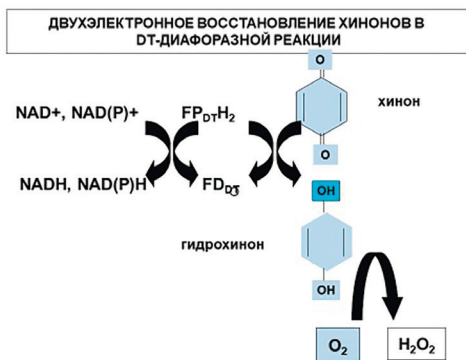


Рисунок 31 – 2-х электронное восстановление хинонов в ДТ-диафоразной реакции

Возможность формирования параллельных путей окисления, из которых один сопряжен с фосфорилированием, а другой (другие) – представлен свободным окислением, показано для бактерий, грибов, растений, а также самых разных клеток млекопитающих. Наиболее разнообразны они в клетках печени. Такие же комбинированные дыхательные системы, состоящие из сопряженных и несопряженных с фосфорилированием потоков, были найдены и в других тканях: мышцах, сердце, мозге, почках, фагоцитирующих клетках. Формирование таких путей приобретает особое значение при разных патологиях, в условиях повреждения функции отдельных участков дыхательной цепи, среди которых нарушения МФК I – самого медленного и наиболее уязвимого этапа в дыхательной цепи – занимают первое место.

Согласно современным представлениям, синергизм в работе двух типов окисления является условием, обеспечивающим нормальное функционирование энергетического аппарата клетки и предельную эффективность этого процесса (наивысший темп образования АТФ), и может достигаться лишь при оптимальной комбинации сопряженного и свободного окисления. Активация свободного окисления может быть необходима при реализации целого ряда физиологических функций: терморегуляторном образовании тепла, метаболизме ксенобиотиков, активации физической работы, образовании стероидных гормонов, усилении детоксицирующей активности фагоцитирующих клеток, на определенных стадиях деления клеток и пр.

Первым соединением из группы хинонов, окислительно-восстановительные свойства которого изучались в биологических системах с целью влияния на редокс-потенциал клетки, был гидрохинон (Лабори, 1965), который был использован в качестве антигипоксического средства для вывода организма из состояния клинической смерти. Из-за высокой токсичности, однако, большинство этих веществ не получили практического применения.

Позже изучались и другие эндогенные и экзогенные редокс-системы – субстраты ДТ-диафоразы: нафтохиноны, аминоксенохиноны, ортохиноны, производные фенотиазина и др. Эрнстером же было показано, что синтетическое водорастворимое производное хинонов – витамин K_3 (менадион: 2-метил-1,4-нафтохинон) также является субстратом ДТ-диафоразы и обладает свойством шунтировать свободным окислением начальный и средний сегменты дыхательной цепи. Такой же способностью обладает и другое производное хинонов из группы витамина К – витамин K_1 (викасол), который также способен играть роль редокс-переносчика в дыхательной цепи и шунтировать поток восстановительных эквивалентов на участке флавопротеиды – цитохромы. Доказано, что активация витамином K_3 или викасолом дыхания, блокированного ротеиноном (ингибитор МФК I) и антимицином, (ингибитор МФК III), сопряжена с восстановлением электрон-транспортной функцией на цитохромном участке и генерацией $\Delta\mu H$ (Mokhova et al., 1977).

Исследование энерготропных свойств группы витамина К показало, что в тканях, в которых преобладает НАД-зависимый путь окисления (мозг; миокард НУ крыс), витамин K_3 обладает выраженным антигипоксическим действием (Корнеев, Лукьянова, 1987; Корнеев и др., 1990; Лукьянова и др., 1992; Лукьянова, Корнеев и др., 1992; Попова, Замула, 1989). На ранних стадиях гипоксии при подавлении МФК I он способствует восстановлению

дыхания, силы сердечных сокращений, увеличению в миокарде содержания АТФ, восстановлению импульсной активности нейронов. Защитное действие витамина K_3 показано и на изолированных нейронах мозжечка, на которых моделировали гипоксию нарастающей тяжести. И в этом случае вещество способствовало сохранению фоновой импульсной активности нейронов в более широком диапазоне концентраций pO_2 , задерживало появление ее депрессии, способствовало восстановлению спайковой активности (Власова и др., 1978; Лукьянова, Власова, 1991а).

Энерготропные эффекты витамина K_3 , связанные с восстановлением переноса электронов на участке НАДН-СoQ-цитохромы, доказываются наличием в его присутствии ротенон~~не~~чувствительного дыхания при сопутствующем окислении дыхательных переносчиков (ПНН и ФП) и при сохранении чувствительности к цианиду – ингибитору терминального фермента дыхательной цепи – ЦХО. Активация свободного окисления характеризуется аналогичными изменениями пиридинов и флавинов при резком снижении чувствительности ротенон~~не~~чувствительного дыхания к цианиду (появление или увеличение цианидрезистентного дыхания). Антигипоксические эффекты витамина K_3 максимально выражены на ранней стадии гипоксии, когда вещество способствует восстановлению дыхания, силы сердечных сокращений, увеличению в миокарде содержания АТФ, восстановлению импульсной активности нейронов (Корнеев, Лукьянова, 1987; Корнеев и др., 1990). При увеличении дефицита кислорода защитное действие витамина K_3 существенно уменьшается, либо даже отсутствует или становится ингибирующим.

Наряду с этим следует учитывать индивидуальную резистентность организма к кислородной недостаточности. В тканях с преобладанием НАД-зависимого пути окисления (мозг, миокард *неустойчивых* к гипоксии крыс) витамин K_3 обладает максимально выраженным антигипоксическим действием и восстанавливает аэробный синтез энергии и энергозависимые процессы. Это определяет дифференцированную тактику фармакологической защиты энергетического аппарата различных тканей и органов.

Витамин K_3 и его аналоги были использованы в медицинской практике ряда зарубежных клиник в качестве лекарственных средств при некоторых миопатиях, связанных с врожденной недостаточностью основного фермента МФК I НАДН-цитохром *c*-редуктазы. Однако из-за сравнительно высокой их токсичности, так же как и других синтетических хинонов, обладающих донорно-акцепторными свойствами, а также из-за их способности окрашивать ткани, их применение в практической медицине ограничено.

В последние два десятилетия активно проводится поиск энерготропных средств среди *флавоноидов* – продуктов полифенольного типа, имеющих растительное происхождение. Флавоноиды – это пигменты растений, составляющие до 30% их химического состава и синтезирующиеся из фенилаланина.

В молекуле флавоноидов имеется хинонная структура, которая сообщает этим веществам окислительно-восстановительные свойства и способность переносить электроны от дегидрогеназ и пиридиннуклеотидов через уби-хинон. Общим структурным компонентом разных флавоноидов являются два бензольных кольца (А и В) соединенных между собой трехуглеродной

цепочкой (пропановый мостик) – $C_6-C_3-C_6$. (рис. 32). Сложная комбинация гидроксильных групп, сахаров, кислорода и метильных групп, прикрепленных к этим структурам, создают различные классы флавоноидов: флавонолов, флавононов, флавонов, флаван-3-олс (катехинов), антоцианинов, изофлавонов.

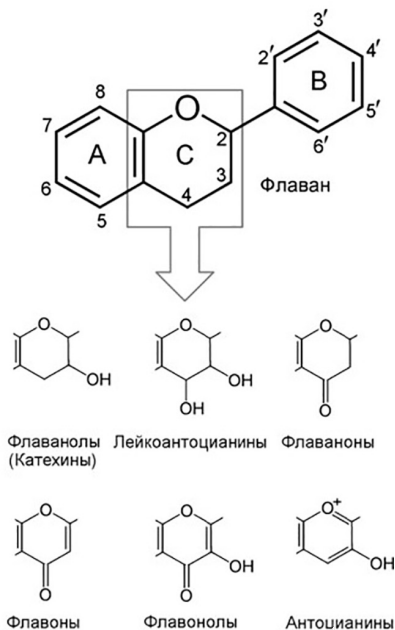


Рисунок 32 – Флавоноиды. Структурные различия

Хорошо известные антиоксидантные свойства флавоноидов связаны с наличием в их структуре слабых фенольных гидроксильных групп, которые легко отдают свой атом водорода при взаимодействии со свободными радикалами. Большинство флавоноидов (кверцетин, рутин, байкалеин, кипферол, куркумин, силимарин, полифенолы зеленого чая) являются ингибиторами циклооксигеназы и липоксигеназы, которые активируют окисление арахидоновой кислоты с образованием простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов. С этим могут быть связаны защитные эффекты антинеопластических эффектов этих флавоноидов. Известно также, что они являются сквенджером гидроксильного радикала, супероксиданиона, пероксинитрита. Имеются данные, что они секвестрируют ионы металлов, участвующих в окислении.

Спектр биологической активности флавоноидов очень широк. Они являются биологически активными веществами и регулируют рост растений, активность многих ферментов, оказывают антимикробное и противовирусное действие. Они характеризуются также антимутагенной, антиаллергической, антинеопластической, противовоспалительной, вазодилаторной, адаптогенной, антигипоксической активностями. Этот список постоянно расширяется. Флавоноиды нетоксичны относительно живых клеток и являются важной составляющей пищи человека. Их дневная норма в пище – 1-2 г.

Флавоноиды и их метаболиты обладают модулирующим действием на активность многих ферментов. Их эффекты реализуются через действие на сигнальные пути фосфоинозитид 3-киназы, Akt/протеинлипазы В, тирозин киназы, протеин киназы С и митоген активированной протеин киназы (МАРК). Ингибиторное или активирующее действие на эти пути способны нарушить фосфорилирование молекул-мишеней в клетках и модулировать экспрессию генов. Различные флавоноиды подавляют оксидацию липопротеинов низкой плотности— источников компонентов для атеросклеротических нарушений и холестерина, прерывая первое звено атерогенеза. С этим механизмом связан «французский парадокс»: низкий уровень сердечно-сосудистых заболеваний в популяции при содержании в пище французов большого количества насыщенных жирных кислот. Этому способствует красное сухое вино, традиционно потребляемого французами, содержащее красные полифенолы, которые подавляют оксидацию липопротеинов низкой плотности.

В настоящее время насчитывается более 6000 разновидностей биофлавоноидов, среди которых наиболее широко представлены рутин, кверцетин, дигидрокверцетин, гесперидин, нарингин, пикногенол, кемпферол, генистеин. Наличие хиноновых радикалов в их структуре позволяет предполагать возможность их взаимодействия с дыхательной цепью митохондрий в качестве акцепторов или переносчиков восстановительных эквивалентов.

Специально проведенные исследования, действительно, подтвердили, что самые разнообразные флавоноидсодержащие препараты растительного происхождения (амла, гинкго билоба, бадан, экстракт Курильского чая, экстракты винограда красного, вытяжка из корней пиона, экстракты остролодочника остролистного, гребней винограда, родиолы розовой, шлемника байкальского, крапивы двудомной, пажиты обыкновенной и др.) являются субстратами фермента ДТ-диафоразы и обладают витамин-К₃-подобным, антигипоксическим и адаптогенным действием. Оно выражается в способности всех этих веществ в условиях гипоксии и сопутствующего подавления электронтранспортной функции МФК I дозозависимо стимулировать ротеноннечувствительное дыхание и активировать как 1) электрон-транспортную функцию цитохромного участка дыхательной цепи, так и 2) свободное, несопряженное окисление (см. схему на рис. 20) (Лукьянова, 2009).

При *низких* концентрациях большинство исследованных флавоноидсодержащих растительных препаратов активируют преимущественно сопряженное (митохондриальное) окисление, коррелирующее с максимальной выраженностью их антиоксидантных свойств. При высоких их концентрациях, как правило, превалирует свободное окисление, коррелирующее с ослаблением антиоксидантных свойств, либо даже с появлением прооксидантной активности.

Таким образом, *максимальная эффективность их энерготропного действия проявляется при низких их концентрациях*, что позволяет предполагать наличие у них в этом диапазоне концентраций антигипоксических свойств.

Между флавоноидсодержащими препаратами растительного происхождения существуют различия в *интенсивности и соотношении* сопряженного и несопряженного компонентов стимулируемого ими дыхания. Это соотношение дозозависимо, строго индивидуально и определяет энерготропные

и, видимо, токсические свойства растительного препарата. Оптимальным соотношением этих потоков при низких концентрациях веществ (максимальная мощность митохондриального окисления – минимальная активность немитохондриального окисления) обладают амла, экстракт Курильского чая и в меньшей степени – гинкго билоба.

С помощью дикумарола–ингибитора ДТ-диафоразы доказано, что инициируемый такими препаратами ротеноннечувствительный поток электронов обусловлен активностью фермента ДТ-диафоразы. Из этого следует вывод, что *биологическим субстратом для ДТ-диафоразной реакции являются полифенольные соединения, входящие в состав флавоноидсодержащих препаратов растительного происхождения.*

Более того, активация ими электрон-транспортной функции цитохромного участка дыхательной цепи (митохондриального окисления) способствует восстановлению ее сопрягающей функции, подавляемой при ингибировании МФК I, и определяет их энерготропные (энергизующие) свойства, которые способствуют восстановлению синтеза энергии в клетке и, благодаря этому, обеспечивают их антигипоксические эффекты. Это их свойство является исключительно важным внутриклеточным регуляторным механизмом, участвующим в поддержании энергетического гомеостаза клетки.

Таким образом, дополнительно к широкому спектру биологических активностей, которыми обладают флавоноиды, входящие в состав растительных препаратов, добавляется одна из наиболее важных их функций – *их способность взаимодействовать с дыхательной цепью и в условиях нарушения электрон-транспортной функции отдельных ее участков формировать шунтирующие пути переноса электронов.*

Следует, однако, иметь в виду одно очень важное свойство метаболизма биофлавоноидов: активация ДТ-диафоразного пути окисления **конкурентно подавляет активность сукцинатоксидазного окисления и наоборот.** В силу этого совместное применение флавоноидсодержащих препаратов растительного происхождения и сукцината не только не способствует потенцированию их раздельного антигипоксического эффекта и не усиливает их энерготропные свойства, но может приводить к ослаблению их влияния на формирование срочной резистентности, к снижению защитного эффекта. Следовательно, создание препаратов комбинированного действия на основе сукцинатсодержащих веществ и флавоноидов противопоказано.

Это же указывает на необходимость продолжения разработки тактики профилактического и терапевтического применения энерготропных препаратов растительного происхождения в условиях гипоксии с целью оптимизации регулирования метаболических потоков, обеспечивающих дыхательную цепь энергетическими субстратами. Значимость данного направления усиливается в связи с тем, что как сейчас уже ясно, нарушения функции МФК I характерны не только для гипоксии, но практически для любой патологии. Они показаны при апоптозе, некрозе, травматическом шоке, воспалительном процессе, старении, эндотоксикозах, алкогольном отравлении, инфекционных заболеваниях, кардиомиопатиях, нефропатиях, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, сахарном диабете I типа, туберозном склерозе, моногенных заболеваниях соединительной ткани и др. Во всех

случаях диагностируется митохондриальная дисфункция, требующая коррекции с помощью энерготропных средств.

Оно выражается в способности всех этих веществ в условиях гипоксии и сопутствующего подавления электрон-транспортной функции МФК I шунтировать в низких концентрациях этот путь и восстанавливать электрон-транспортную функцию цитохромного участка дыхательной цепи. Поэтому активация ДТ-диафоразного пути окисления в условиях гипоксии и патологий с сопутствующей дисфункцией МФК I предупреждает нарушения аэробного синтеза энергии и способствует увеличению толерантности организма к гипоксии.

На рис. 33 видно, что флавоноидсодержащий препарат экстралайф (экстракт курильского чая) уже через 30 минут после введения увеличивает резистентность как НУ, так и ВУ крыс. Совместное применение экстралайфа и ГБГ (однократной тренировки в барокамере на высоте 5000 м, 10% O₂ во вдыхаемом воздухе) потенцирует их действие. Ингибитор ДТ-диафоразы дикумарол снимает защитное действие препарата. Это доказывает, что механизм защитного действия связан с активацией шунтирующего МФК I пути.

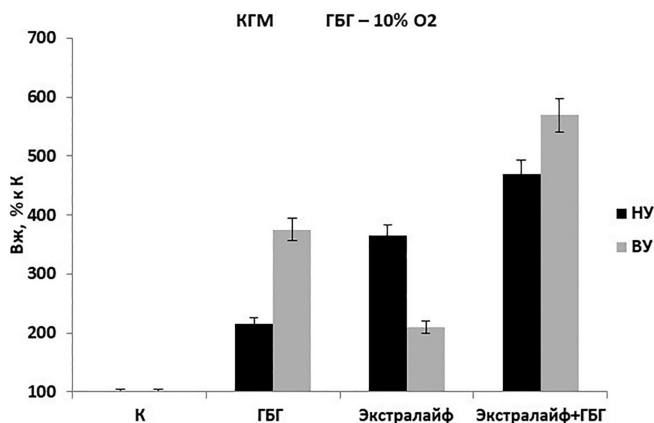


Рисунок 33. – Действие экстралайфа на параметры резистентности в условиях гипобарической гипоксии у ВУ и НУ крыс.

Экстралайф – в/б введение (40 мг/кг) за 30 минут до подъема в барокамере (гипобарическая гипоксия -ГБГ)

Резистентность к ГБГ оценивали по времени жизни (Вж) – на высоте 11 500 м; (10,5% O₂ в атмосферном воздухе)

Витамин-К₃-подобное действие флавоноидов сопровождается не только восстановлением в миокарде внутриклеточного содержания АТФ и сократительной функции сердца, что отражает их энерготропную и антигипоксическую активность, но и модулирующим влиянием на двигательную активность и другие энергозависимые процессы, а также антистрессорным, антиоксидантным, адаптогенным, седативным, анксиолитическим действием. Показано, например, что экстралайф существенно замедляет развитие синдрома Паркинсона, болезни, сопровождающейся ингибированием как МФК I, так МФК II.

Существенное преимущество флавоноидов перед синтетическими хинонами заключается в их малой токсичности. Однако следует помнить, что передозировка может привести к нерегулируемой активации свободноради-

кальных процессов – результат инициируемого ими при этом свободного, несопряженного окисления.

6.3 Коррекция терминального участка дыхательной цепи при гипоксии энерготропными препаратами прямого действия

6.3.1 *CoQ и его аналоги*

CoQ – это редокс-активная жироподобная и витаминоподобная субстанция, обязательный компонент внутренней мембраны митохондриальной дыхательной цепи, выполняющий роль кофактора. Главной его функцией является перенос электронов в митохондриальной дыхательной цепи от МФК I и МФК II к МФК III (см. рис. 1).

При гипоксии может развиваться дефицит CoQ в митохондриальной дыхательной цепи, связанный с его выходом в межмембранное пространство и приводящий к нарушению переноса электронов на участке МФК III. Учитывая, что CoQ является одним из компонентов дыхательной цепи и влияет на текучесть митохондриальных и клеточных мембран, снижение его уровня может привести к трагическим последствиям, связанным с необратимыми нарушениями функции различных органов. Все это определило изучение возможности компенсации дефицита эндогенного убихинона в организме с помощью экзогенного убихинона.

Наибольшее количество коэнзима Q содержится в сердце, печени и почках млекопитающих, т.е. в тканях с интенсивным обменом веществ. В свою очередь, основная масса внутриклеточного убихинона содержится в митохондриях: в митохондриях млекопитающих содержится 40-50% от общего количества убихинонов, в ядре – 25-30%, микросомах – 15-20% (Ramasarma, 1985).

Первая попытка использования CoQ₇ для лечения сердечной недостаточности была предпринята в Японии (Jayaraman et al., 1963; Yamamura, 1977). Позднее в Японии наладили промышленную технологию получения чистого CoQ₁₀, который применялся в клинических исследованиях, интенсивно проводившихся в последующие десятилетия во многих странах и прежде всего в Японии и США. В настоящее время до 80% населения Японии принимает CoQ₁₀ в качестве профилактического лекарственного средства. В 1987 г. CoQ был объявлен в США незаменимым пищевым компонентом для организма (Ely, Krone, 2000).

При обосновании применения CoQ в качестве энерготропного средства необходимо было ответить на несколько принципиальных вопросов: 1) проникает ли убихинон при его экзогенном введении в организм через биологические мембраны и если да, то как быстро и где он локализуется; 2) встраивается ли он при этом во внутреннюю митохондриальную мембрану, способствуя восстановлению электрон-транспортной функции дыхательной цепи и синтеза АТФ; 3) на какие функциональные параметры влияет терапевтическое применение убихинона; 4) какие дозы убихинона должны быть рекомендованы для терапевтического применения; 5) какие формы (аналоги) убихинона эффективны при его терапевтическом введении.

На сегодняшний день следует считать доказанным, что экзогенный CoQ_{10} при его попадании в организм накапливается в разных тканях, но более всего в сердце. Основным местом его внутриклеточной локализации являются митохондрии. Содержание в них CoQ_{10} может многократно превышать его концентрацию в плазме крови и в тканях.

Экзогенный CoQ_{10} в условиях нарушения функции МФК I проявляет энерготропные свойства и дозозависимо способствует восстановлению энергетического заряда, адениннуклеотидного пула клетки, митохондриального мембранного потенциала, эффективности ОФ. Он предотвращает снижение АТФ и КФ; препятствует распаду АТФ и образованию его метаболитов; подавляет активацию каспазы-3, фрагментацию ДНК и апоптоз; снижает свободнорадикальную активность, увеличивает антиоксидантную активность и содержание токоферола.

Профилактическое его применение перед гипоксией полностью подавляет выход из миокарда креатинкиназы и метаболитов АТФ – инозина и гипоксантина. При гипоксии CoQ_{10} также уменьшает содержание инозина и аденозина в миокарде, т.е. препятствует распаду АТФ и накоплению его метаболитов (Корягин и др., 2002; Крылов и др., 2000; Крылов, Лукьянова, 2004; Genova, Lenaz, 2011).

Таким образом, *экзогенный убихинон действительно способствует улучшению либо восстановлению электрон-транспортной функции клетки. При этом снижается свободнорадикальная активность тканей, увеличивается их антиоксидантная способность и повышается содержание в них токоферола.*

Особую значимость экзогенный CoQ имеет, по-видимому, для миокарда, где его содержание максимально. Положительные эффекты CoQ показаны при кардиоваскулярных патологиях: гипертонии, заболевании коронарных артерий, острой коронарной недостаточности, остром инфаркте миокарда (быстрые защитные эффекты в первые 3 дня после проявления симптомов сердечной атаки), при лечении хронической сердечной недостаточности. CoQ_{10} в дозе 100–200 мг/сутки приводит к улучшению показателей ударного объема и сердечного выброса. Однако рефрактерная перегрузка при сердечной недостаточности устраняется более высокими его дозами. По-видимому, наиболее оптимальным при данной патологии следует считать использование высокодозовой терапии.

При применении убихинона в качестве кардиопротектора проявляется и его *антиоксидантное действие*. Показано, например, что CoQ_{10} уменьшал глубину окислительного стресса, способствовал повышению уровня других антиоксидантов, таких как витамины А, Е и С и β -каротин.

В последнее время появилось большое количество работ, посвященных применению убихинона при различных патологиях, сопровождающихся *митохондриальными дисфункциями*, так или иначе связанными с *генетическими дефектами*. Положительный эффект корригирующей терапии убихинонами был получен у больных *мышечной дистрофией*. Так, у пациентов с *митохондриальными цитопатиями*, получавших CoQ_{10} , повышалась эффективность работы дыхательной цепи, что подтверждалось увеличением содержания АТФ, КФ и свободного клеточного Mg^{2+} ,

а также снижением содержания неорганического фосфата и АДФ. После лечения CoQ_{10} у больных наблюдали увеличение потребления кислорода в мышцах, которое коррелировало со снижением суммарного уровня сывороточного лактата и пирувата и увеличением общей силы сокращения мышц, а также улучшением функциональных показателей мозга. Терапия таких больных CoQ_{10} в течение 6 месяцев нормализовала соотношение лактат/пируват в венозной крови, которое было патологически нарушено при этом заболевании.

CoQ успешно применяется и при *неврологических* заболеваниях (мозговые инсульты, заболевания, связанные с дефектами СДГ, болезни старения). При курсовом назначении в динамике развития синдрома Паркинсона он был более эффективен, чем другие энерготропные препараты–корректоры дисфункции МФК I и II.

Применение убихинона открывает перспективы лечения угрожающей жизни кардиомиопатии, которая часто развивается при самой распространенной форме наследственной атаксии Фридрейха. Положительный эффект от применения CoQ_{10} показан при некоторых случаях мозжечковой атаксии и мозжечковой атрофии, развитие которых объясняют дефицитом CoQ_{10} . При лечении CoQ_{10} клиническое состояние этих пациентов улучшалось, хотя и в различной степени.

Экзогенный убихинон оказался эффективным при лечении: инсулинозависимого сахарного диабета, связанного с мутацией 3243 митохондриальной тРНК, острых желудочно-кишечных нарушений у больных с наследственными генетически обусловленными митохондриальными энцефалопатиями, болезни Хантингтона. Известно, что эта болезнь, вызванная мутацией генов, может оказывать как первичное, так и вторичное влияние на энергетический метаболизм. Лечение CoQ_{10} (600–1200 мг/сутки) привело к значительному снижению концентрации кортикального лактата. При этом показана хорошая его переносимость, что делает CoQ_{10} перспективным при долговременном клиническом использовании для замедления прогрессирования заболевания.

Убихинон обладает *радиопротекторными* свойствами. Биологическое действие убихинона-9 в организме нормальных и облученных крыс проявляется, помимо других эффектов, в ингибировании синтеза холестерина. Уменьшение образования холестерина и, возможно, уменьшение поступления желчи в кишечник может быть одной из причин благотворного действия убихинона-9 при лучевом поражении. Радиозащитное действие было недавно показано и для убихинона-10. Применение убихинона-10 (2 и 10 мг/кг 7 суток) в терапии экспериментальной лучевой болезни у крыс (облучение в дозе 3 гр) приводило к гемозащитному эффекту, выражавшемуся в предотвращении анемии, эритро- и лейкопении, нормализации эритро-, нейтрофило- и лимфопоэза.

Корректирующие свойства экзогенного убихинона проявляются независимо от возраста больных, однако *у стареющего организма их эффект выражен в большей степени*. Так убихинон-10 приводил к глубоким корректирующим изменениям сердечной функции у старых крыс, в то время как у молодых животных заметного эффекта не наблюдалось. Показано, что при старении как у крыс, так и у людей происходило снижение активности

МФК II. Эти изменения исчезали при применении убихинона-10: через 2 недели у крыс и 4 недели у людей активность комплекса восстанавливалась до уровня, характерного для молодого организма.

Положительные эффекты убихинона показаны и у детей. Так при терапии доброкачественной детской митохондриальной миопатии, вызванной дефицитом цитохром-с-оксидазы, применение карнитина и убихинона-10 приводило к нормализации уровня лактата в крови в течение первых 3 недель, а в дальнейшем наблюдалось излечение и нормализация развития ребенка.

После применения убихинона-10 наблюдалось значительное снижение количества липопротеинов в сыворотке крови пациентов с острой коронарной недостаточностью, что указывает на ограничение атеросклеротических процессов, хотя роль в них убихинона остается неясной, поскольку его синтез в организме идет параллельно с образованием холестерина. Возможно, что при патологии нарушается равновесие этих процессов.

Так как имеются данные о том, что экзогенный CoQ_{10} потенцирует МФК II (~200%), можно было предположить, что его применение совместно с субстратами МФК II при гипоксии будет усиливать его антигипоксическое действие. Однако это не подтвердилось экспериментально. Оказалось, что и CoQ_{10} , и сукцинатсодержащий препарат цитофлавин способствовали увеличению резистентности крыс в условиях ОГБГ. Однако при их совместном применении аддитивное действие не только отсутствовало, но происходило резкое уменьшение способности животных переносить гипоксическую нагрузку. Аналогичная картина наблюдалась при совместном применении CoQ_{10} и флавоноидсодержащего препарата экстралайф – субстрата ДТ-диафоразы. Каждый из них порознь резко увеличивал резистентность крыс к острой гипоксии, но при совместном применении их антигипоксический эффект снижался.

Эти факты говорят против того, что экзогенный CoQ_{10} включается в пул митохондриального убихинона, связанного с электрон-транспортной функцией дыхательной цепи, на участках МФК II или МФК III.

Экстрамитохондриальные функции убихинона. Внутриклеточный убихинон находится не только в митохондриях, но и в других органеллах. Функция экстрамитохондриального убихинона пока точно не установлена. Предполагается, что окислительно-восстановительные циклы убихинона, ассоциированные со специфическими окислительно-восстановительными цепями мембран аппарата Гольджи и лизосом, способствуют одностороннему распределению протонов в этих органеллах. В общем, убихинон в восстановленной форме, по-видимому, проявляет свою антиоксидантную активность во всех клеточных мембранах.

Экстрацеллюлярное действие убихинона. Помимо внутриклеточного действия, убихинон также может обеспечивать антиоксидантную защиту любого компонента, присутствующего в биологических жидкостях организма, который подвергается оксидативному повреждению. В частности, хиноны могут функционировать в крови, предотвращая окисление липопротеинов низкой плотности, свободнорадикальное повреждение с участием нейтрофилов при воспалительных заболеваниях, оксидативное повреждение при участии эндотелиальных клеток, обусловленное ишемией–репер-

фузией. В эксперименте и в клинике получены убедительные доказательства того, что после перорального приема CoQ_{10} его концентрация в крови быстро нарастает. Через экзогенные взаимодействия с поверхностью клеток циркулирующие в крови хиноны влияют на активность оксидоредуктазы плазматической мембраны, которая катализирует восстановление цитозольным НАДН множества экстрацеллюлярных компонентов. Поэтому вполне вероятно, что ожидаемая польза от применения CoQ_{10} действительно связана, хотя бы отчасти, с проявлением его активности в циркулирующей крови.

Дозы убихинона, рекомендуемые для терапевтического применения.

Положительные эффекты CoQ дозозависимы. Отрицательные данные, полученные в ранний период применения CoQ в качестве лекарственного препарата, связывают именно с использованием слишком малых его доз. Однако считается, что с учетом его собственного синтеза в организме, который снижается с возрастом, а также малой его токсичностью, доза должна составлять субоптимальную дозу, но может достигать 400–800 мг/сутки. При этом частота выявления побочных эффектов низкая (1,5%). У большинства пациентов отмечено улучшение качества жизни, судя по снижению проявления основных клинических симптомов и синдромов.

Масляные растворы убихинона более активно усваиваются организмом. Фармакокинетические исследования, проведенные с убихиноном-10 отечественного производства, показали, что при скормливании животным (2–25 мг/кг) его концентрация в плазме крови достигала максимума уже через 3–4 часа после введения, в миокарде и печени – через 5–6 часов с последующим снижением уровня в течение суток.

Фармакологические формы убихинона. Доступными фармакологическими формами CoQ_{10} являются биологически активные добавки кудесан (водорастворимая форма CoQ_{10} с витамином С), а также синтетические формы CoQ_{10} , производимые разными фирмами, и лекарственное средство **идебенон** – CoQ_6 (нобен), отличающийся сниженной гидрофобностью. Идебенон обладает окислительно-восстановительными свойствами аналога хинона с возможным антиоксидантным действием и способен взаимодействовать с другими носителями окислительно-восстановительных свойств, включая CoQ_{10} дыхательной цепи митохондрий. LD_{50} идебенона для грызунов при внутрибрюшинном введении составляет примерно 10 г/кг массы тела, а при подкожном и пероральном введении LD_{50} увеличивается. Безопасность идебенона для человека (60–300 мг) установлена в долгосрочных испытаниях (2 года) на людях преклонного возраста, у которых не было зарегистрировано никаких значительных побочных эффектов. Однако идебенон, как и другие аналоги хинона, является редокс-активным веществом с характерными кинетическими свойствами в отношении прочих носителей окислительно-восстановительного потенциала, включая компоненты комплексов дыхательной цепи. *In vitro* он способен конкурировать за электроны с природным CoQ_{10} в изолированных митохондриях и перенаправлять некоторую часть (величина варьируется) электронов за счет потока электронов к кислороду, особенно из МФК I. Быстро восстанавливаясь, таким образом идебенон оказывает мощное антиоксидантное действие на поверхности внутренних мембран митохондрий. В России на рынке лекарств в настоящее время появился идебенон под торговым названием **нобен**.

Следует также иметь в виду, что начальные стадии синтеза убихинона и холестерина совпадают (до стадии фарнезил пирофосфата) (рис.34). Поэтому прием статинов – ингибиторов этого синтеза – может привести к уменьшению образования эндогенного убихинона, блокированию энергообеспечения скелетных мышц и миокарда и провоцировать развитие миопатий и дисфункции сердца.

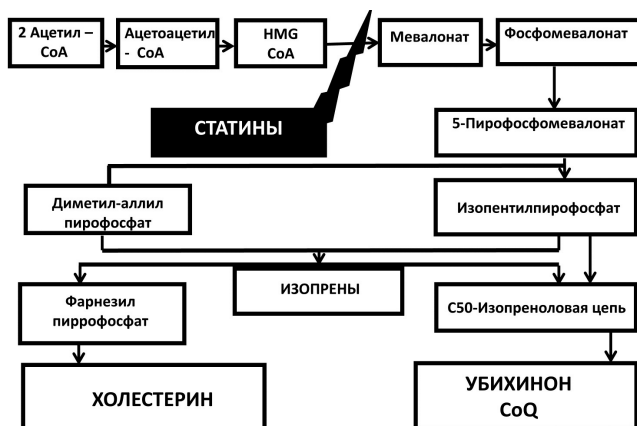


Рисунок 34 – Действие статинов на метаболизм убихинона и холестерина

6.3.2 Цитохром с

Экспериментально доказано, что экзогенный цитохром с при гипоксическом воздействии способен проникать через клеточную и митохондриальную мембраны и, встраиваясь в дыхательную цепь, способствует восстановлению окислительного фосфорилирования.

На определенных стадиях гипоксии в связи с лабилизацией мембран происходит выход цитохрома с из митохондрий. Поэтому поддержание стабильного его уровня в митохондриях необходимо для сохранения процесса окислительного фосфорилирования и предотвращения апоптоза (Новиков, 1990; Алексеева и др., 1990; Андрианова и др., 1990).

Цитохром с применяют в комплексной терапии в качестве средства, улучшающего тканевое дыхание, при состояниях, сопровождающихся нарушением окислительно-восстановительных процессов в организме: асфиксии новорожденных; тяжелых травмах; до и после оперативного вмешательства (с целью предупреждения шока), в период ремиссии бронхиальной астмы с наличием дыхательной недостаточности, у больных с хронической обструктивной болезнью легких и сердечной недостаточностью; при вирусном гепатите, осложненном печеночной комой; при отравлении снотворными препаратами и окисью углерода.

Комбинированным препаратом, содержащим цитохром с, является **энергостим** (Лукьянова, Дудченко, Романова, Германова, Сукоян, Карсанов, 1997). В его состав помимо цитохрома с (10 мг) входят никотинамидину-

клеотид (0,5 мг) и инозин (80 мг). Данная комбинация обладает аддитивным эффектом, где эффекты НАД и инозина дополняют антигипоксическое действие цитохрома с. При этом экзогенно вводимый НАД несколько уменьшает дефицит цитозольного НАД и восстанавливает активность НАД-зависимых дегидрогеназ, участвующих в синтезе АТФ, способствует интенсификации работы дыхательной цепи. За счет инозина достигается увеличение содержания общего пула пуриновых нуклеотидов. Препарат предлагается применять при ишемии, а также при состояниях, сопровождающихся развитием гипоксии.

6.4 Антигипоксанты непрямого (неспецифического) действия

К этой группе веществ относится большое количество самых разнообразных препаратов, как правило, с неизвестным молекулярным механизмом действия, но обладающих теми или иными физиологическими антигипоксическими свойствами.

Более-менее четко выраженную целевую группу составляют ингибиторы окисления жирных кислот, используемые в настоящее время преимущественно в комплексной терапии ишемической болезни сердца. При гипоксии в митохондриях происходит накопление недоокисленных активированных форм жирных кислот (ацилкарнитин, ацил-КоА), которые способны блокировать адениннуклеотидтранслоказу (что сопровождается подавлением транспорта в цитозоль произведенного в митохондриях АТФ) и повреждать мембраны клеток, оказывая детергентное действие.

Среди них выделяют прямые ингибиторы карнитин-пальмитоилтрансферазы-I (пергекселин, этомоксир), парциальные ингибиторы окисления жирных кислот (ранолазин, триметазидин, мельдоний), и не прямые ингибиторы окисления жирных кислот (карнитин) (Оковитый и др., 2012).

Пергекселин и **этомоксир** способны угнетать активность карнитин-пальмитоилтрансферазы-I, нарушая таким образом перенос длинноцепочечных ацильных групп на карнитин, что приводит к блокаде образования ацилкарнитина. Вследствие этого падает внутримитохондриальный уровень ацил-КоА и уменьшается NAD^+/NADH соотношение, что сопровождается повышением активности пируватдегидрогеназы и фосфофруктокиназы, а следовательно, стимуляцией окисления глюкозы, что является более энергетически выгодным по сравнению с окислением жирных кислот.

Пергекселин назначается перорально в дозах 200-400 мг в сутки длительностью до 3-х месяцев. Препарат может комбинироваться с антиангинальными препаратами, однако, его клиническое применение ограничивается неблагоприятными эффектами – развитием нейропатии и гепатотоксичностью. Этомоксир используют в дозе 80 мг в сутки длительностью до 3-х месяцев, однако вопрос о безопасности препарата окончательно не решен, учитывая тот факт, что он является необратимым ингибитором карнитин-пальмитоилтрансферазы-I.

Триметазидин, ранолазин и мельдоний относят к парциальным ингибиторам окисления жирных кислот. **Триметазидин** (Предуктал) блокирует

3-кетоацилтиолазу, один из ключевых ферментов окисления жирных кислот. В результате тормозится окисление в митохондриях всех жирных кислот – как длинноцепочечных (количество атомов углерода больше 8), так и короткоцепочечных (количество атомов углерода меньше 8), однако никаким образом не изменяется накопление активированных жирных кислот в митохондриях. Под влиянием триметазидина увеличивается окисление пирувата и гликолитическая продукция АТФ, уменьшается концентрация АМФ и АДФ, тормозится накопление лактата и развитие ацидоза, подавляется свободнорадикальное окисление.

Раннее включение триметазидина в комплексную терапию острого периода инфаркта миокарда способствует ограничению размера некроза миокарда, предотвращает развитие ранней постинфарктной дилатации левого желудочка, увеличивает электрическую стабильность сердца, не влияя на параметры ЭКГ и вариабельность сердечного ритма.

Мельдоний (Милдронат) обратимо ограничивает скорость биосинтеза карнитина из его предшественника – γ -бутиробетаина. Вследствие этого нарушается карнитин-опосредованный транспорт длинноцепочечных жирных кислот через мембраны митохондрий без воздействия на метаболизм короткоцепочечных жирных кислот. Это означает, что мельдоний практически не способен оказывать токсического действия на дыхание митохондрий, так как не может полностью блокировать окисления всех жирных кислот. Частичная блокада окисления жирных кислот включает альтернативную систему производства энергии – окисление глюкозы, которая значительно эффективнее (на 12%) использует кислород для синтеза АТФ. Кроме того, под влиянием мельдония повышается концентрация γ -бутиробетаина, способного индуцировать образование NO, что приводит к уменьшению общего периферического сопротивления сосудов (ОПСС).

Мельдоний, как и триметазидин, при стабильной стенокардии уменьшает частоту приступов стенокардии, повышает толерантность больных к физической нагрузке и снижает потребление короткодействующего нитроглицерина. Препарат малотоксичен, не вызывает существенных побочных эффектов, однако при его использовании могут отмечаться кожный зуд, высыпания, тахикардия, диспепсические явления, психомоторное возбуждение, снижение АД.

Карнитин (витамин B_r) является эндогенным соединением и образуется из лизина и метионина в печени и почках. Он играет важную роль в переносе длинноцепочечных жирных кислот через внутреннюю мембрану митохондрий, в то время как активация и проникновение низших жирных кислот происходит без карнитина. Кроме того, карнитин играет ключевую роль в образовании и регуляции уровня ацетил-КоА.

Физиологические концентрации карнитина обладают насыщающим действием на карнитин-пальмитоилтрансферазу I, а увеличение дозы препарата не повышает транспорт ацильных групп жирных кислот в митохондрии при участии данного фермента. Однако это приводит к активации карнитин-ацилкарнитинтрансферазы (которая не насыщается физиологическими концентрациями карнитина) и падению внутримитохондриальной концентрации ацетил-КоА, который транспортируется в цитозоль (через

образование ацетилкарнитина). В цитозоле избыток ацетил-КоА подвергается воздействию ацетил-КоА-карбоксилазы с образованием малонил-КоА, который обладает свойствами непрямого ингибитора карнитин-пальмитоилтрансферазы I. Уменьшение же интрамитохондриального ацетил-КоА коррелирует с повышением уровня пируватдегидрогеназы, которая обеспечивает окисление пирувата и ограничивает продукцию лактата. Таким образом, антигипоксическое действие карнитина связано с блокадой транспорта жирных кислот в митохондрии, является дозозависимым и проявляется при назначении высоких доз препарата, в то время как низкие дозы обладают лишь специфическим витаминным действием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технический прогресс и методические инновации последних десятилетий в области клеточной и молекулярной биологии открыли новые возможности для изучения взаимодействия структуры и функции различных внутриклеточных систем, что неизбежно повлияло на многие традиционно сложившиеся о них представления. Это касается в первую очередь уникальной внутриклеточной органеллы – митохондрии, которая на протяжении полувека рассматривалась главным образом как энергетическая силовая станция клетки. В процессе эволюции митохондрии приобрели исключительное значение в жизнедеятельности аэробов как главный внутриклеточный источник энергии, необходимый для нормальной жизнедеятельности, и стали играть ведущую сигнальную роль в клеточном метаболизме, в важнейших регуляторных процессах, определяющих внутриклеточные, межклеточные и системные взаимодействия. С митохондриями связана организация работы огромного количества энергозависимых реакций, обеспечивающих жизнедеятельность организма. В то же время они являются мишенью, подвергающейся модификациям при различных заболеваниях, старении, во время внешних и внутренних стрессорных воздействиях, и прежде всего при гипоксии. Все это положило начало появлению новых направлений в биологии: *митохондриальной физиологии, митохондриальной патофизиологии и митохондриальной фармакологии*.

В монографии впервые систематизированы экспериментальные данные, подтверждающие правомочность такой классификации и рассматривающие регуляторную роль митохондриального аппарата в условиях кислород-дефицитных состояний.

Гипоксия – одно из самых распространенных патологических состояний, связанных с дефицитом кислорода в окружающей клетку среде и являющихся причиной широкого спектра функционально-метаболических нарушений в организме. Давно уже установлено, что в условиях дефицита кислорода энергетический обмен является мишенью для гипоксии. Подавление аэробного синтеза энергии в этих условиях, приводящее к сопряженному подавлению энергозависимых процессов, лежит в основе мультисистемности и полиорганности сопутствующих нарушений, характерных для гипоксии.

В предисловии к монографии был обозначен целый ряд актуальных вопросов, касающихся молекулярных, биоэнергетических механизмов гипоксии и адаптации, которые не получили до настоящего время достаточного освещения. В связи с этим в монографии впервые анализируются имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные, подтверждающие, что *митохондриальная дыхательная цепь в условиях in vivo вовлечена в систему внутриклеточной, трансмембранной и межклеточной сигнализации*, а сами митохондрии функционируют как активные сигнальные органеллы, принимающие участие в передаче информации по самым различным внутриклеточным сигнальным путям и играют ключевую роль в важнейших регуляторных физиологических

процессах. Более того, доказывается, что существует выраженная *сцепленность параметров, характеризующих особенности организации работы дыхательной цепи, и «функционально-метаболический портрет» животных с разной резистентностью к гипоксии.*

Митохондрии *дифференцируют тяжесть гипоксического воздействия.* В условиях *in vivo* реакция митохондриального аппарата на изменение оксигенации представляет собой сложный многоступенчатый процесс, фазный характер которого зависит от силы и длительности гипоксического воздействия, что определяет формирование качественно различных ответных реакций. В целом они *отражают смену метаболических путей окисления энергетических субстратов и изменения эффективности работы дыхательной цепи, влияющих на степень энергизации клетки.*

Изменения электрон-транспортной функции дыхательной цепи при этом начинаются на субстратном (НАД-зависимом) участке. Первые признаки реакции митохондрий на дефицит O_2 появляются при его снижении до 12-14% сравнительно с атмосферным (21% O_2). При этом может происходить кратковременная *активация электрон-транспортной функции МФК I*, сопровождаемая усилением синтеза АТФ. Процесс отражает *срочный компенсаторный механизм мобилизации базовых энергетических ресурсов клетки* в условиях относительно небольшого снижения концентрации кислорода в окружающей среде (*стадия первичной активации адаптационных процессов*).

При усиливающемся гипоксическом воздействии в определенном диапазоне сниженных концентраций кислорода (до 10% O_2) происходит *компенсаторная активация альтернативных МФК I путей окисления субстратов* в дыхательной цепи, поставляющих восстановительные эквиваленты к МФК III и IV. Среди них особую роль играет *МФК II* (сукцинатоксидазный путь окисления). Этот процесс позволяет сохранить поступление восстановительных эквивалентов на цитохромный участок дыхательной цепи и синтез энергии на уровне, необходимом для полноценного поддержания внутриклеточных энергозависимых процессов в условиях высокой восстановленности ПНН. В этот период происходят максимально выраженные ультраструктурные изменения в митохондриях, отражающие срочное адаптивное усиление их функциональной активности, более выраженные у НУ животных. При этом способность к формированию срочных адаптивных защитных механизмов усиливается (степень выраженности срочной экспрессии транскрипционного гипоксического фактора HIF-1 α и срочной толерантности животных достигают в этих условиях своего максимума).

При снижении концентрации кислорода до 8% и менее роль сукцинатоксидазного окисления в качестве энергетического субстрата снижается. Однако при этом активируются ряд шунтов окисления, сопряженных с эндогенным образованием сукцината, которые способствуют снижению степени восстановленности ПНН и восстановлению работы МФК I. Тем не менее, это состояние отражает перенапряжение системы и сопряжено с появлением нарушений ультраструктуры митохондрий, а также снижением экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 α (*начальная стадия декомпенсации энергетического обмена*).

Динамика биоэнергетических изменений при гипоксии развивается по законам **типового патологического процесса** и является **базисным биоэнергетическим** механизмом любых форм гипоксии, их обязательным составляющим элементом.

Таким образом, дыхательная цепь в условиях снижения доставки кислорода к клеткам вовлекается в процесс как единая функционально-метаболическая система, выполняющая роль регулятора и модулятора потребления кислорода и скорости его поступления из внеклеточной среды к митохондриям. Этот механизм играет роль внутриклеточной триггерной системы, сигнализирующей об изменениях содержания кислорода во внеклеточной среде и запускающей каскад функционально-метаболических внутриклеточных реакций, отражающих ответ организма на дефицит кислорода на системном уровне.

Митохондриальная дыхательная цепь в условиях гипоксии участвует в формировании как **ранних, так и поздних адаптивных признаков**, благодаря чему обеспечивается формирование системного ответа организма на дефицит кислорода. Адаптационные реакции являются реакциями, предупреждающими повреждение организма. Благодаря им достигается оптимальное функционирование и сбалансированность всех систем организма.

Однако оптимальные условия для их формирования создаются в ограниченном диапазоне концентраций кислорода. При этом срочные и долгосрочные биоэнергетические механизмы адаптации к гипоксии различаются.

Срочные компенсаторные реакции к гипоксии реализуются в условиях **подавления НАДН-оксидазного окисления** через **активацию сукцинатоксидазного пути окисления**, способствующего формированию толерантности организма к гипоксии.

Долгосрочные адаптационные реакции связаны с **восстановлением НАД-зависимого пути окисления и постепенной утратой значимости сукцинатоксидазного окисления**. Для длительной адаптации к гипоксии характерна также экономизация процесса образования энергии, которая происходит за счет появления новой популяции митохондрий с новыми свойствами: сниженным содержанием дыхательных переносчиков на терминальном участке дыхательной цепи и более низкой их окислительной способностью, но работающих в более эффективном режиме, который достигается путем увеличения эффективности окислительного фосфорилирования. В целом оба эти процесса направлены на восполнение потерь АТФ, которое должно было бы происходить в условиях гипоксии. При этом происходят не только количественные, но и качественные изменения свойств ферментов дыхательной цепи и взаимодействия МФК I и МФК II.

Длительная адаптация животных к гипоксии влияет противоположным образом на резистентность ВУ и НУ животных. У НУ она увеличивается, у ВУ не меняется или даже снижается. Все это коррелирует с изменением кинетических свойств ферментов дыхательной цепи.

Сравнительный анализ действия разных гипоксических режимов на формирование срочной и отсроченной резистентности организма позволил выявить ряд принципиально новых и важных для практической гипокситерапии моментов.

Срочная резистентность к гипоксии начинает формироваться с первых минут любого гипоксического воздействия (гипобарическая гипоксия – ГБГ, нормобарическая гипоксия – НБГ, интервальная гипоксия – ИНГ) и достигает максимальных значений в первые 30-60 минут.

Индукция *срочной* резистентности происходит быстрее при применении безынтервальных форм гипоксии (ГБГ, НБГ) сравнительно с интервальными (ИНГ).

Фактором, определяющим *формирование срочной* резистентности, является *гипоксический* период, а не период реоксигенации, который задерживает и угнетает этот процесс; более того, оксигенированные интервалы ослабляют реакцию организма на гипоксию.

При *курсовом* применении ИНГ оксигенированные интервалы выполняют, по-видимому, своеобразную регуляторную, нормирующую роль. Они ослабляют раздражающий эффект гипоксии и предотвращают возможность ее передозировки.

Динамика формирования неспецифической резистентности организма при применении разных режимов *курсовой* гипокситерапии носит фазный характер, зависящий от типа гипоксического воздействия и фенотипических особенностей животных.

Эффект формирования как *срочной*, так и *отсроченной* резистентности к гипоксии генетически детерминирован, т.к. убывает в ряду: НУ > ВУ к гипоксии животных.

Таким образом, анализ эффектов различных режимов гипокситерапии на резистентность организма позволяет сделать заключение, что ***активация механизмов, ответственных за формирование адаптации к гипоксии, происходит в период действия гипоксического фактора и подавляется в период реоксигенации.*** Однако именно это создает преимущества курсовому применению ИНГ перед безынтервальными гипоксическими режимами. Оксигенированные интервалы ослабляют раздражающий эффект гипоксического стимула и предотвращают тем самым нежелательные последствия, связанные с его передозировкой. Т.е. они выполняют своеобразное регуляторное нормирующее действие. Благодаря этому при курсовом применении ИНГ создаются оптимальные условия, необходимые для формирования долгосрочной адаптации. Очевидна также необходимость дальнейшего изучения роли соотношения гипоксический интервал/оксигенация с целью оптимизации режимов гипокситерапии для повышения резистентности ВУ особей.

Анализ влияния разных режимов *курсовых гипоксических тренировок* на состояние субстратного участка дыхательной цепи (МФК I) свидетельствует о том, что при этом происходят качественно однозначные регуляторные перестройки работы дыхательной цепи, направленные на активацию энергетически более эффективного в условиях гипоксии пути окисления субстратов – сукцинатаоксидазного (МФК II). Однако при курсовом применении ИНГ подавление МФК I было выражено слабее, а компенсаторное переключение работы дыхательной цепи на усиление сукцинатаоксидазного окисления – больше, чем при применении других режимов гипоксических тренировок. Т.е. в этом случае эффективность энергетической регуляции

была выше. Это коррелировало с высокой резистентностью животных, прошедших курсовую тренировку в этих условиях.

При отсутствии или слабо выраженной активации сукцинатоксидазного окисления, как это имело место в случае с ГБГ, формирование резистентности было затруднено.

В отличие от НУ крыс, в КГМ ВУ животных, у которых не наблюдалось достоверного увеличения резистентности в условиях разных режимов гипоксических тренировок, не происходило и достоверных изменений в состоянии МФК II, хотя в первые 10 минут после применения ИНГ отмечалась усиление электрон-транспортной функции МФК I. Это еще раз подтверждает, что активации МФК I не связана с формированием адаптивных реакций. Таким образом, *сукцинат действительно необходим для формирования срочных и долгосрочных адаптивных реакций, и эффективность гипоксической тренировки может быть усилена при сочетанном применении гипоксических тренировок и приема сукцинатсодержащих препаратов.*

Однако этот механизм работает только у НУ животных и практически не реализуется у ВУ особей.

Анализ особенностей сукцинат-зависимой сигнальной регуляции, участвующей в формировании срочных и отсроченных молекулярных механизмов адаптации гипоксии и увеличении резистентности организма к дефициту кислорода, позволяет говорить о том, что *сукцинат выступает в роли сигнальной молекулы*, реализующей свои эффекты при гипоксии по типу аутокринного сигнала через активацию транскрипционного гипоксического фактора HIF-1 α и рецептора GPR91 (рис. 35).

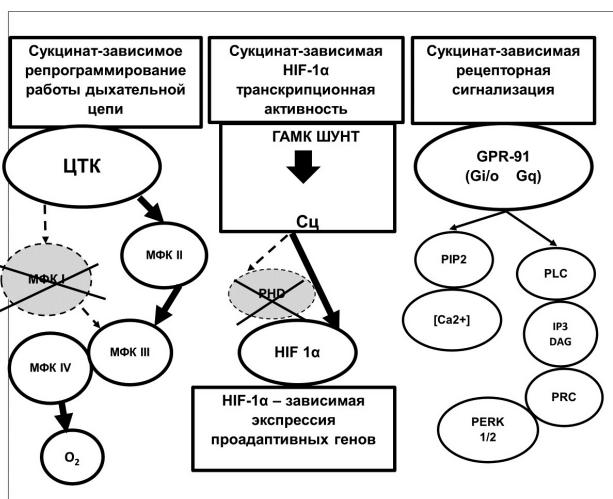


Рисунок 35 – Регуляторная роль сукцината при гипоксии, связанная с работой дыхательной цепи, ГАМК-шунта и GPR91

Таким образом, в условиях *in vivo* реализуется сложная, многокомпонентная система срочного регулирования стабильности HIF-1 α , обеспечивающая оптимальные условия для его экспрессии. Индуцируемая гипок-

сией сукцинат-зависимая срочная экспрессия HIF-1 α тканеспецифична, фенотипична, дозозависима. Гипоксическая активация этой системы в КГМ – мишени для HIF-1 α - характерна для НУ крыс, имеет короткий латентный период (30 минут), развивается в широком диапазоне сниженных концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе, подавляется при тяжелых формах гипоксии, сопровождается формированием срочной и отсроченной защитно-адаптивной резистентности этих животных к дефициту кислорода, зависит от активности как сукциноксидазного окисления (МФК II), так и ГАМК-шунта и индуцируется сукцинатсодержащими препаратами, т.е. регулируется сукцинатом эндогенного и экзогенного происхождения.

Репрограммирование работы дыхательной цепи в условиях гипоксии и переключение на сукциноксидазный путь окисления создает предпосылки для индукции в этих условиях еще одного сукцинат-зависимого сигнального пути – экспрессии рецептора GPR91.

Срочная и отсроченная гипоксическая экспрессия GPR91 индуцируются более всего в КГМ, где она идентифицируется уже через 15 мин. после начала воздействия, и связана с активностью ГАМК-шунта, являющегося в этих условиях главным источником сукцината как для рецептора, так и для дыхательной цепи.

Гипоксическая индукция GPR91 связана с индукцией VEGF у НУ и ВУ крыс в *ограниченном диапазоне умеренно сниженных концентраций* O₂ во вдыхаемом воздухе (10,5% O₂).

В круг рассматриваемых в монографии вопросов включен анализ роли ПОЛ и окислительно-восстановительных процессов при формировании адаптивных к гипоксии реакций, который показал, что гипоксическое воздействие в режиме прекондиционирования может приводить как к срочной активации свободно-радикальных процессов, так и их подавлению. Направленность реакции тканеспецифична, зависит от особенностей метаболизма тканей, их окислительно-восстановительных свойств и соотношения в них про- и антиоксидантных систем.

Гипоксическое прекондиционирование способствует формированию срочной резистентности организма, более выраженному у НУ к гипоксии животных, в тканях у которых отсутствуют в ранний постгипоксический период признаки окислительного стресса. Наоборот, в тканях ВУ животных, обладающих более низкой способностью к формированию резистентности, гипоксическое прекондиционирование стимулирует появление признаков активации свободно-радикальных процессов. Из этого следует, что активация свободно-радикальных процессов в период формирования ранних адаптивных признаков не участвует в инициации срочных механизмов адаптации. Кроме того, гипоксическое прекондиционирование может приводить к противоположным изменениям окислительного метаболизма и состояния антиоксидантных систем в тканях у животных, характеризующихся генетически детерминированными различиями в чувствительности к гипоксии.

Концепция последовательности нарушений в системе митохондриальных ферментов в условиях кислородной недостаточности, являющихся причиной развития энергодефицита, и наличие нескольких лимитирующих

участков процесса позволили не только выявить мишени, на которые должна быть направлена фармакологическая коррекция функции энергетического аппарата (*«энерготропная терапия»*), но и сформулировать тактику и стратегию антигипоксической защиты. Под *«энерготропной терапией»* подразумевается использование в качестве лекарственных средств веществ, способных взаимодействовать с митохондриальной дыхательной цепью и предупреждать в условиях патологии нарушения энергетического обмена. Медицинская практика показывает, что дальнейшее развитие этого направления чрезвычайно перспективно и актуально.

Однако динамика энергетических нарушений при гипоксии нарастающей тяжести или длительности указывает на то, что один и тот же энерготропный препарат будет обладать неодинаковым защитным эффектом в разные периоды биоэнергетической гипоксии. Поэтому сукцинат-монотерапия может быть оптимально эффективной в условиях компенсаторной активации МФК II (эффекты гипоксии *«средней тяжести»*), в то время как при *«тяжелой гипоксии»* будут иметь преимущества комбинированные препараты типа цитофлавина и энергостима, либо малат-фумарат содержащие инфузионные растворы, либо другие средства, способные активировать окислительно-восстановительные процессы, направленные на снижение степени восстановленности субстратного участка дыхательной цепи. Следовательно, должен быть достаточно широкий спектр энерготропных средств с разным механизмом действия, эффекты которых будут направлены на разные стадии гипоксических нарушений и разные биоэнергетические мишени.

Кроме этого очевидно также, что принципиальное значение для получения положительных результатов энерготропной терапии имеет оценка индивидуальной резистентности организма к гипоксии.

Поэтому важнейшей задачей дальнейшего развития этого направления является разработка экспресс-тестов для лабораторных исследований, позволяющих проводить оценку как степени энергетических нарушений, так и толерантность организма к дефициту кислорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаджанян Н.А., Миррахимов М.М. [1970]. Горы и резистентность организма. – М.: Наука, – 184 с.
2. Агаджанян Н.А. [1983]. Адаптация и резервы организма. – М.: ФиС, 176 с.
3. Агаджанян Н.А., Чижов А.Я. [2003]. Гипоксические, гипоксические и гиперкапнические состояния. Изд. Медицина. 96 с.
4. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К, Дж. Уотсон. [1994]. Эволюция клетки. Молекулярная биология клетки, 2-е издание, «Мир».
5. Алексеева Н.Н., Слепнева Л.В., Селиванов Е.А. [1990]. Лечебная эффективность цитохрома С, выделенного из миокарда различных видов животных при геморрагическом шоке. Цитохром С и его клиническое применение. Л.: ЛНИИ-ГиПК. С. 20-24.
6. Андрианова И.Г., Сидорова Н.Д. [1974]. Энергетический обмен – триггерный механизм в формировании срочных и длительных механизмов адаптации к гипоксии// Клинич. медицина. – №3. – С. 12-16.
7. Андрианова И.Г., Сидорова Н.Д., Селиванов Е.А. [1990]. Результаты клинического изучения инъекционной и таблетированной формы цитохрома С// Цитохром С и его клиническое применение. Л.: ЛНИИГиПК, С. 30-37.
8. Арбузов А., Пастушенков Л.В. [1969]. Фармакологические средства, повышающие устойчивость к гипоксии // Фармакол. и токсикол. №1. С. 115-120.
9. Атабаева Р.К., Шепелева С.Ю.Германова ЭЛ Лукьянова Л.Д. [1992]. О корреляции антигипоксических эффектов сукцинатсодержащих производных оксипиридинов на изолированном сердце и в условиях *in vivo*. Ж.Экспер. клинич. фармакол. т.55. №1. С.255-263
10. Ахмеров Р.Н., Кондрашова М.Н., Казуева Т.В. [1971]. Сукцинат – преимущественно окисляющийся субстрат в условиях гипоксии // В сб. «Биология и научно-технический прогресс».- М.-Пушино. – Наука.- с.3-6.
11. Бакеева Л.Е., Ясаятис А.А. [1972]. Изменения структуры митохондрий в ответ на функциональные воздействия. Сб. Митохондрии. М. 1972. С.56-64.
12. Бакеева Л.Е., Скулачёв В.П., Ченцов Ю.С. [1977]. Митохондриальный ретикулум: строение и возможные функции внутриклеточных структур нового типа в мышечной ткани. II Вестн. Моск. ун-та.№3.С.23-38.
13. Бакеева Л.Е., Скулачёв В.П., Ченцов Ю.С.[1982]. Межмитохондриальные контакты кардиомиоцитов. Цитология. №2. С.161-166.
14. Бакеева Л.Е., Шевелёв Ф.Ф., Ченцов Ю.С., Скулачёв В.П. [1985]. Изучение структуры межмитохондриальных контактов кардиомиоцитов крыс методом замораживания-скальвания. Биологич. Мембраны. Т.2.- №2. С.133-143.
15. Барбашова З.И. [1960]/ Акклиматизация к гипоксии и ее физиологические механизмы. – М. Л., Изд. АН СССР. С.216.
16. Белоусова В.В., Дудченко А.М., Лукьянова Л.Д. [1992]. О соотношении энергопотребляющих и энергосинтезирующих реакций в гепатоцитах крыс при разных кислород-дефицитных состояниях. БЭБМ. т. 114.- в. 12.- С.588-590.
17. Березовский В.А. [1975] Напряжение кислорода в тканях животных и человека. Киев. Наукова Думка. 279с.
18. Березовский В.А. [1978]. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности. К.: «Наукова думка». 216 с.

19. Боголепов Н.Н. [1979]. Ультраструктура мозга при гипоксии. М.: Медицина. 167 с.
20. Богомолов В.И., Лукьянова Л.Д. [1992]. Сравнительный анализ белков КГМ крыс с разной чувствительностью к гипоксии. БЭБМ. т.114.- в.12.- С.657-659
21. Бресткин, М.П. [1968]. *Функции организма в условиях изменений газовой среды* . Л. ВМА. СПб. 63 с.
22. Виноградов Ю.М., Урюпов О. [1985]. Гипоксия как фармакологическая проблема // Фармакол. и токсикол. – N 4. – С. 9-20.
23. Виноградская И.С. [2014]. Морфометрический анализ митохондрий при наследственно обусловленных состояниях скелетной мышечной ткани. Дисс. К.б.н. М
24. Власова И.Г., Лукьянова Л.Д., Уголев А.Т. [1978]. Морфологические, электрофизиологические и метаболические показатели функционирования нейронов мозжечка в условиях культуры тканей. Цитология. N4.С.405-411.
25. Воронина Т. А. [2001]. Антиоксидант мексидол. Основные нейрорепаративные эффекты и механизм действия . Психофармакол. и биол. наркол. Т. 1, № 1.- С. 2–12.
26. Воронина Т.А. [2013]. Мексидол: спектр фармакологических эффектов. Медицинский альманах. № 1. – С. 145-146.
27. Воронина Т. А., Смирнов Л. Д., Горяйнова И. И. [2002]. Механизмы действия и особенности применения препарата мексидол в неврологии. М., 14 с.
28. Воронина Т. А., Смирнов Л. Д., Дюмаев К. М. [2000.]. Возможности применения мексидола в экстремальных ситуациях // Человек и лекарство: Тез. докл. VII Рос. нац. конгр. М. С. 483.
29. Галактионов К.В. [2002]. Современное многообразие живого и пути его становления. Материалы к лекциям. СПбГУПМ. 80с.
30. Галенко-Ярошевский П.А., Чекман И.С., Горчакова Н.А. [2001]. Очерки фармакологии средств метаболической терапии. М.: Медицина.
31. Грамов Б.В. [1985]. Строение бактерий. Л.: Изд-во Ленингр. гос. ун-та. 200с.
32. Гусев Е.И., Скворцова В.И. [2001]. Ишемия головного мозга. М., Медицина. С. 226.
33. Деркачев Э.Ф., Маевский Е.И., Каминский Ю.Г. [1996]. Действие янтарной кислоты на ткани, возможно, имеет сигнальный характер // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве / Под ред. М.Н. Кондрашовой, Ю.Г. Каминского, Е.И. Маевского. – Пушкино: Ин-т теоретической и экспериментальной биофизики РАН, С. 259-261.
34. Дудченко А.М. [1976]. Сравнение дегидрогеназ митохондрий коры головного мозга крыс, обладающих различной чувствительностью к гипоксии. // Митохондрии. М, Наука, с. 177-182.
35. Дудченко А.М. [2003]. Энергетический метаболизм и механизмы стабилизации АТФ в гепатоцитах при гипоксии. М. дисс.докт.
36. Дудченко А.М., Белоусова В.В., Лукьянова Л.Д. [1996]. Влияние адаптации к периодической гипоксии на кинетические параметры ферментов дыхательной цепи мозга крыс. БЭБМ. № 3. С. 252-255.
37. Дудченко А.М., Лукьянова Л.Д. [1995]. Действие адаптации к периодической гипоксии на содержание цитохромов в мозгу и печени крыс // БЭБМ, т.120, №3, с.576-579.

38. Дудченко А.М., Лукьянова Л.Д. [2003]. Параметры аденилатного пула как предикторы нарушений энергетического обмена в гепатоцитах при гипоксии. БЭБМ. Т. 136. №7. с.41-44
39. Дудченко А.М., Лукьянова Л.Д. [2004]. Триггерная роль энергетического обмена в каскаде функционально-метаболических нарушений при гипоксии // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты / Под ред. Л.Д.Лукьяновой, И.Б.Ушакова. – М.: Истоки, С. 51-83.
40. Дудченко А.М., Чернобаева Г.Н., Белоусова В.В. и др. [1993а]. Биоэнергетические параметры мозга крыс с различной резистентностью к гипоксии // БЭБМ, т. 115, с.251-254.
41. Дудченко А.М., Чернобаева Г.Н., Белоусова В.В., Власова И.Г. Лукьянова Л.Д. [1993б]. Влияние различных концентраций кислорода на содержание АТФ в изолированных гепатоцитах адаптированных и неадаптированных к гипоксии крыс. БЭБМ.- т.116- N12.- С. 1268-1272
42. Дымищ Г.М. [2002]. Сюрпризы митохондриального генома. Природа, №6,
43. Евсеева М.А., Евсеев А.В., Правдивцев В.А., Шабанов П.Д. [2008]. Механизмы развития острой гипоксии и пути ее фармакологической коррекции. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Том: 6, № 1. С. 3-25
44. Ещенко Н.Д. [1999]. Энергетический обмен в головном мозге // Биохимия мозга. Под ред. И.П. Ашмарина, П.В. Стукалова, Н.Д. Ещенко. СПб.: Издательство С.-Петербургского Университета. С. 124-168.
45. Жигачева И.В., Мохова Е.Н., Скулачев В.П. [1976]. Активация внешнего пути окисления в митохондриях печени при охлаждении крыс.- ДАН СССР.т.227.- с.493-496.
46. Заболотский Н.Н., Онищенко Л.С., Галеев И.Ш. [1999]. Митохондриальные мегакония и плейокония в головном мозге крыс как возможные адаптационные реакции при летальных радиационных и радиомодифицированных повреждениях // Морфология.Т. 115, №3. С. 27-31.
47. Загускин С.Л. [2006]. Функциональная регуляция энергетики нейрона. Морфология, т.129. №2. С. 40-41.
48. Загускина Л.Д. [1978]. Прижизненное исследование митохондрий в нервной клетке. Цитология. 18(2): 230-233.
49. Загускин С.Л., Загускина Л.Д. [1977]. Пространственно-временная организация митохондрий в нервной клетке в состоянии покоя и возбуждения. Цитология. 19(9): 951-958.
50. Загускин С.Л., Загускина Л.Д. [1996]. Ритмы микроструктур нервной клетки речного рака и их физиологическое значение. Морфология. 4: 90-95.
51. Загускин С.Л., Загускина Л.Д., Загускина С.С. [2007]. Внутриклеточная регуляция потребления кислорода в нейроне рецептора растяжения речного рака. Цитология. т.49. №10. С.832-838.
52. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. [2001]. Общая патофизиология. Учебник для студентов мед.вузов-СПб. С.624.
53. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. [2004]. Молекулярная фармакология антигипоксантов. – СПб.: Изд-во Н-Л. 368 с.
54. Зеркаленкова Е. А. [2015]. Влияние малой ГТФ-азы RAC1 на взаимодействие виментиновых промежуточных филаментов с митохондриями. Дисс к.б.н. М.
55. Иванченко М.В., Твердохлеб И.В. [2014]. Влияние внутриутробной гипоксии на гетерогенитет митохондрий и пути его реализации при альтерации желудочкового миокарда крыс. Вестник Волгоградского ГМУ. Вып. 4(52) с. 101-105.

56. Капелько В.И., Новикова Н.А., Рахманова Т.Б. [1968]. Сократительная функция желудочков сердца при тренировке к высотной гипоксии. Кардиология. Т.1 С.111.
57. Караваева Ю.Е., Шехирева К.В., Северин Ф.Ф., Кнорре Д.А. [2015]. Нужен ли трансмембранный потенциал для слияния митохондрий. Биохимия. Т. 80, вып. 5, с. 651 – 66
58. Караиш Ю. М., Стрелков Р. Б., Чижов А. Я. [1988]. Нормобарическая гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации. М. Медицина. 351 с.
59. Кашуро В.А., Долго-Сабуров В.Б., Башарин В.А., Бонитенко Е.Ю., Лапина Н.В. [2010]. Некоторые механизмы нарушения биоэнергетики и оптимизация подходов к их рмакотерапии. www.medline.ru, т. 11. фармакология, декабрь. С. 611-634
60. Кирова Ю.И. [2012]. Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1a в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии. Патол. физиол. и эксп. терапия. №3. С. 51-55.
61. Кирова Ю.И. [2014]. Роль системы глутатиона в регуляции окислительно-восстановительного статуса коры головного мозга крыс при гипоксии // Патол. физиол. и эксп. терапия. № 4. С. 40-47.
62. Кирова Ю. И. [2016]. Регуляторная роль сукцинатзависимых сигнальных систем (HIF-1a и GPR91) при адаптации к гипоксии. М. Дисс. дбн.
63. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. [2012]. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1a в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // Бюлл. эксп. биол. и мед. Т. 154, № 12. С. 681-686.
64. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. [2013]. Фенотипические особенности экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, и редокс-статус клеток неокортекса крыс на разных стадиях адаптации к гипоксии. Фізіологічний журнал. Т. 59, № 6. – С. 99-111.
65. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. [2015]. Сукцинатзависимый рецептор GPR91: особенности его экспрессии в тканях при гипоксии // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация / Под ред. В.П.Зинченко, А.В. Бережнова. Пушчино: Fix-Print. Т. 2. С. 497-484.
66. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Пальцын А.А., Романова Г.А., Рыбникова Е.А., Лукьянова Л.Д. [2014]. Ранние изменения экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1a (HIF-1a) в неокортексе крыс с разной толерантностью к острой гипоксии, перенесших фокальный ишемический инсульт префронтальной коры. Патол. физиол. и эксп. терапия. № 3. С. 9-16.
67. Колчинская А.З. [1992]. Механизмы действия интервальной гипоксической тренировки // Интервальная гипоксическая тренировка. Киев. С. 107-113.
68. Коваленко Е.А., Черняков И.Н. [1972]. Кислород тканей при экстремальных факторах полета. Сер.:Проблемы космической биологии. М.,Наука.Т.21.200 с.
69. Колчинская А.З. (п/ ред) [1983]. Сб.: Вторичная тканевая гипоксия. Киев. Наукова Думка. 256 с.
70. Кондрашова М.Н. [1968]. Биохимический цикл возбуждения. Митохондрии. Ферментативные процессы и их регуляция. М. Наука. с. 122-131.
71. Кондрашова М.Н. [1969]. Метаболические состояния митохондрий и основные физиологические состояния живой ткани. Свойства и функции макромолекул и макромолекулярных систем. М. Наука. с.135-160.

72. Кондрашова М.Н. [1970]. Регуляция дыхания митохондрий при усиливающемся воздействии на клетку. Биофизика. 15. с.312-323.
73. Кондрашова М.Н. [1971а]. Градации метаболического состояния митохондрий и реактивность ткани. В кн.: Митохондрии. М. Наука . с. 25-40.
74. Кондрашова М.Н. [1971б]. Янтарная кислота в скелетных мышцах при интенсивной деятельности и в период отдыха // Журн. Докл. АН СССР. Т. 198, № 1. С. 243-246.
75. Кондрашова М.Н. [1972]. Накопление и использование янтарной кислоты в митохондриях. Митохондрии. Под ред. М.Н. Кондрашовой.- М. Наука. С. 151-170.
76. Кондрашова М.Н. [1976]. Биохимические основы физиологического влияния янтарной кислоты и общая характеристика ее действия на организм // Терапевтическое действие янтарной кислоты. Под ред. М.Н. Кондрашовой. Пушкино: НЦБИ АН СССР. С. 8-30.
77. Кондрашова М.Н. [1989]. Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке как механизм адаптации к гипоксии // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. Под ред. Л.Д. Лукьяновой. М.: ВИНТИ. С. 51-66.
78. Кондрашова М.Н. [1991]. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани. Биохимия. № 3. – С. 388-405.
79. Кондрашова М.Н. [2000]. Реципрокная регуляция дыхания и структурного состояния митохондрий гормонально-субстратной системой // Митохондрии, клетки и активные формы кислорода. Под ред. М.Н. Кондрашовой. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН. С. 71-74.
80. Кондрашова М.Н. [2002а]. Гормоноподобное действие янтарной кислоты. Вопр. биол. мед. и фарм. химии. 1:7-12.
81. Кондрашова М.Н. [2002б]. Взаимодействие метаболической и гормональной регуляции (биоэнергетические аспекты). В сб. Регуляторы энергетического обмена. п/ред. В.А.Хазанова. IX-ый Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство», с.16-25.
82. Кондрашова М.Н., Ахмеров Р.Н., Акоев И.Г. [1974]. О регуляции соотношения окисления янтарной кислоты и НАД-зависимых субстратов производными индола. Митохондрии. М. Наука. С.145-163.
83. Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В. [1985]. Проявление стресса на уровне митохондрий, их стимуляция гормонами и регуляция гидроаэронами // Журнал общей биологии. – 1985. – Т. 46, № 4. – С. 516-526.
84. Кондрашова М.Н., Захарченко М.В., Самохвалов В.А., Шихлярова А.И. [2002]. Гормоноподобное действие янтарной кислоты. Вопр. Биол. Мед. Фармац. Химии 1.–7. 5.
85. Кондрашова М.Н., Каминский Ю.Г., Маевский Е.И. – отв. ред. [1996]. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. Пушкино.; 300 с
86. Кондрашова М.Н., Маевский Е.И. [1978]. Активация сукцинатдегидрогеназы как основа «анаэробной» работы и устойчивости к гипоксии // Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности / Под ред. М.Н. Кондрашовой.Пушкино: НЦБИ АН СССР. С. 6-12.
87. Кондрашова М.Н., Маевский Е.И., Бабаян И.Р., Саакян И.Р., Ахмеров Р.Н. [1973]. Адаптация к гипоксии посредством переключения метаболизма на превращения янтарной кислоты // Митохондрии, М, Наука, с.112-129.

88. *Кораблев М. В., Лукиенко П. И.* [1976]. Противогипоксические средства – Минск. Беларусь, 128 с.
89. *Корнеев А.А., Лукьянова Л.Д.* [1987]. Особенности энергетического обмена миокарда крыс с разной чувствительностью к кислородной недостаточности Патол. физиол. и Экспер. терапия. N3. С. 53-56.
90. *Корнеев А.А., Попова О.А., Лукьянова Л.Д.* [1990]. Окислительный метаболизм и функция миокарда крыс с различной чувствительностью к кислородной недостаточности в условиях гипоксии и протекторное действие хинонов. Ж. Патол. Физиол. и Экспер. терап. №3. С. 28-30.
91. *Корягин А.С., Крылова Е.В., Лукьянова Л.Д.* [2002]. Действие Убихинона-10 на систему крови с при радиационном облучении крыс. БЭБМ, V.133, N6, pp.650-652
92. *Костюк П.Г., Станика Р.И., Лукьянец Е.А.* [2004]. Внутриклеточные механизмы гипоксических нарушений функции нервной клетки. В кн. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты. п/ред Лукьяновой Л.Д. .М.С.84-95.
93. *Крапивин С.В., Романова В.Е., Воронина Т.А. Лукьянова Л.Д.* [1991]. Электрофизиологические исследования мозга крыс с разной устойчивостью к кислородной недостаточности в условиях острой гипоксии. Физиол.ж. СССР. т.77. №7. С. 1-6
94. *Крыжановский Г.Н.* [2002]. Дизрегуляторная патология. [Рук. для врачей и биологов]. М.: Медицина. 630 с.
95. *Крылов В.Н., Корягин А.С., Ястребова Е.В., Лукьянова Л.Д.* [2000]. Влияние убихинона-10 на энергетический обмен и ПОЛ в миокарде крыс при ишемии. БЭБМ. т.130.- №7.- С. 35-38
96. *Крылов В.Н. Лукьянова Л.Д.* [2004]. Антигипоксическое действие экзогенного убихинона (коэнзима Q). // В кн. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты. п/ред Лукьяновой Л.Д. .М.С. 295-324
97. *Кунин Е.* [2014]. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции. ЗАО «Издательство Центрполиграф».
98. *Кургалюк Н.Н., Абдула Л, Кондрашова М.Н.* [1996]. Реципрокное сукцината и катехоламинам действие введенных а-кетоглутарата натрия и ацетилхолина на окисление субстратов в митохондриях сердца и нейрогуморальный статус организма. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. П/ред Кондрашовой М.Н., Каминского Ю.Г., Маевского Е.И. Пушино. 21-27.
99. *Лабори А.* [1970]. Регуляция обменных процессов. М. Мед. 383 с.
100. *Ливанова Л.М., Саркисов К.Ю., Коломийцева И., Лукьянова Л.Д.* [1991a]. Дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий мозга крыс с разным типом поведения. БЭБМ. т.112. №7. С. 30-32
101. *Ливанова Л.М., Саркисов К.Ю., Коломийцева И.А. Лукьянова Л.Д.* [1991b]. Дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий мозга крыс с разным типом поведения. ЖВНД. т.41, в.5, с. 973-982.
102. *Литвицкий П.Ф.* [2002]. Патифизиология: Учебник. В 2 т. М.: ГЭОТАР. МЕД. т.1.- 752 с., т.2 – 808 с.
103. *Лосев Н. И.* [1995]. Гипоксия. Патифизиология. Под ред. Н. Ф. Литвицкого. М.: Медицина, С. 197-214.
104. *Патифизиология* (под ред. Н. Ф. Литвицкого). М. Медицина. С. 197-214.
105. *Лосев Н.И., Хитров Н.К., Грачев С.В.* [2010]. Патифизиология гипоксических состояний и адаптации организма к гипоксии.- М. – 182с.

106. Лукьянова Л.Д. [1981]. О механизмах регуляции кинетики тканевого дыхания при разных условиях оксигенации. Физиологические и клинические проблемы адаптации к гипоксии, гиподинамии, гипертермии. П/ред. Коробкова А.В.- М.- Медицина. 2: 76-78
107. Лукьянова Л.Д. [1989а]. Биоэнергетические механизмы формирования гипоксических состояний и подходы к их фармакологической коррекции. В кн. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний, сборник трудов ин-та фармакологии АМН СССР, П/ред Лукьяновой Л.Д. Москва. с.11-44.
108. Лукьянова Л.Д. [1989б]. П/ред. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М. ВИНТИ.-192 с.
109. Лукьянова Л.Д. [1991]. Механизмы действия антигипоксантов. Антигипоксанты – новый класс фармакологических веществ. Итоги науки и техники. П/ред Лукьяновой Л.Д, М. с.27: 5-25.
110. Лукьянова Л.Д. [1997]. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы, коррекция // БЭБМ, т.124, № 9, с. 244-254
111. Лукьянова Л.Д. [1999]. Новые подходы к созданию антигипоксантов метаболического действия // Вестн. РАМН, № 3, с. 18-25.
112. Лукьянова Л.Д. [2000]. Современные проблемы гипоксии // Вестн. РАМН, т., № 9, с. 3-12.
113. Лукьянова Л.Д. [2001]. Гипоксия при патологиях. Молекулярные механизмы и принципы коррекции // Перфторорганические соединения в биологии и медицине, Пушино. с. 56-69.
114. Лукьянова Л.Д. [2002]. Дизрегуляция энергетического обмена – типовой патологический процесс // Дизрегуляционная патология / Под. ред. Г.Н. Крыжановского. – М.: Медицина. С. 216-232.
115. Лукьянова Л.Д. [2004а]. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты.- П/ред. Лукьяновой Л.Д, Ушакова И.Б.- М. с. 5-31.
116. Лукьянова Л.Д. [2004б]. Митохондриальная дисфункция – типовой патологический процесс, молекулярный механизм гипоксии. В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты. П/ред. Лукьяновой Л.Д, Ушакова И.Б.- М. с. 5-31.
117. Лукьянова Л.Д. [2004в]. О корреляции между особенностями работы дыхательной цепи у животных с различной индивидуальной резистентностью к гипоксии и их «функционально-метаболическим» портретом. В « Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты». п/ред Лукьяновой ЛД, Ушакова И.Б. С. 156-169.
118. Лукьянова Л.Д. [2005]. Новое об антигипоксантах и их применении: энерготропное, адаптогенное и антиоксидантное действие. Тр. Конгресса «Человек и лекарство». С.127-141
119. Лукьянова Л.Д. [2008]. Сигнальная функция митохондрий при гипоксии и адаптации. Патогенез. 3: 4-12.
120. Лукьянова Л.Д. [2009]. Перспективы энерготропной терапии митохондриальных дисфункций при патологиях включающих гипоксическую компоненту. Тр.XV Российского национального конгресса «ЧЕЛОВЕК И ЛЕКАРСТВО». Т.1 с. 84-105
121. Лукьянова Л.Д. [2011]. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. Патол. физиология и эксп. терапия. 1:3–19.

122. Лукьянова Л.Д., Атабаева Р.Е., Шепелева С.Ю. [1993]. Биоэнергетические механизмы антигипоксического действия сукцинат-содержащего производного 3-оксипиридина мексидола. БЭБМ; 115(3): 366-367
123. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. [1982]. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функция. Москва: Наука. 300 с.
124. Лукьянова Л.Д., Власова И.Г. [1991а]. Нейрональная модель – система для отбора антигипоксантов. //В кн: Итоги науки и техники. Фармакология. Химиотерапевтические средства. Москва. т.27, с.164-176.
125. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. [2009]. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекондиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. БЭБМ. 147(4): 380-384.
126. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Цыбина Т.А., Чернобаева Г.Н. [2009]. Энерготропное действие сукцинатсодержащих производных 3-оксипиридина. БЭБМ. Т.148.-№10:388-392.
127. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Белоусова В.В. [1994]. Влияние различных концентраций кислорода на содержание АТФ в изолированных гепатоцитах адаптированных и неадаптированных к гипоксии крыс // БЭБМ. № 12, с. 1268-1272.
128. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Романова В.Е., Германова Э.Л., Сукоян Г.В., Карсанов Н.В. [1997]. Энергизующие антигипоксические эффекты энергостима. БЭБМ т. 123.- № 6.- С. 659-662
129. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Цыбина Т.А., Германова Э.Л., Ткачук Е.Н., Эренбург И.В. [2007]. Действие интервальной нормобарической гипоксии на кинетические свойства митохондриальных ферментов // БЭБМ. № 12.-С. 644-651.
130. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Чернобаева Г.Н. [1999]. Энергетический обмен – триггерный механизм в формировании срочных и длительных механизмов адаптации к гипоксии // Прерывистая нормобарическая гипоксии. М, с. 139-153.
131. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Чернобаева Г.Н. [2000]. О прогностической роли адениннуклеотидного пула при гипоксии. Митохондрии, клетки и активные формы кислорода. Пушино, с.99-102.
132. Лукьянова Л.Д., Карнаухов В.Н., Зинченко В.П., Уголев А.Т., Кондрашова М.Н. [1976]. Изменение редокс-реакций ПН срезов КГМ крыс на добавление ЯК, амитала и пирувата в зависимости от времени переживания и исходного состояния. Кн: Терапевтическое значение янтарной кислоты.- Наука-Пушино. 1976. С. 146-150.
133. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. [2011]. Влияние гипоксического прекондиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии. БЭБМ. 151(3):263-267.
134. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Германова Э.Л. [2015]. Особенности срочной экспрессии сукцинат-зависимого рецептора GPR91 в тканях при гипоксии. БЭБМ. гипоксии // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2015. – Т. 160, № 12. – С. 703-708.
135. Лукьянова Л.Д., Клейменова Н.Н., Арефолов В.Н., Дудченко А.М. [1991]. Особенности ультраструктуры миокарда крыс с разной резистентностью к кислородной недостаточности после острого и периодического воздействия гипоксии. БЭБМ, т.112, N8, с.148-151.
136. Лукьянова Л.Д., Корнеев А.А., Попова О.А., Замула С.В. [1990а]. Антигипоксические эффекты некоторых хинонов, связанные с восстановлением электрон-транспортной функции дыхательной цепи изолированного сердца крысы. БЭБМ. №7.- С. 60-63.

137. Лукьянова Л.Д., Коробков А.В. [1981]. Некоторые физиологические и метаболические характеристики при адаптации. Физиологические и клинические проблемы адаптации к гипоксии, гиподинамии, гипертермии. П/ред. Коробкова А.В. М.- Медицина. 2: 73-76.
138. Лукьянова Л.Д., Романова В.Е., Чернобаева Г.Н., Лукиных Н.В., Смирнов Л.Д. [1990а]. Особенности антигипоксического действия мексидола, связанные с его специфическим влиянием на энергетический обмен. Хим.-фарм.Ж. №8.- С.9-11.
139. Лукьянова Л.Д., Романова В.Е., Чернобаева Г.Н. [1991б]. Особенности окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс с различной чувствительностью к кислородной недостаточности. БЭБМ. т.113, N7, с.49-51.
140. Лукьянова Л.Д., Чернобаева Г.Н., Власова И.Г., Корнеев А.А., Попова О.А. [1992]. Коррекция нарушений энергетического обмена при гипоксии с помощью витамина К₃. Ж. Экспер. клинич. фармакол. т.55.- №1.- С. 44-47
141. Лукьянова Л.Д., Чернобаева Г.Н., Романова В.Е. [1995]. Влияние адаптации к периодической гипоксии на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс с различной резистентностью к кислородной недостаточности. БЭБМ. № 12. – С. 572-575.
142. Маевский Е.И. [2000]. Анаэробное образование сукцината и облегчение его окисления. Возможные механизмы адаптации клетки к кислородному голоданию. Биомедицинский журнал «Medline.ru». Т. 1, Ст. 3. – С. 32-36.
143. Маевский Е.И., Е.В. Гришина. [2017]. Биохимические основы механизма действия фумарат – содержащих препаратов. Биомедицинский журнал medline.ru. Т. 18. СТ. 2 . стр. 50-80.
144. Маевский Е.И., Гришина Е.В., Окон М.С., Брустовицкий Н.Н. [1996]. Сравнительная оценка энергетического вклада анаэробного образования сукцината из различных субстратов в митохондриях печени. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. П/ред. М.Н. Кондрашовой. Пушино: Ин-т теоретической и экспериментальной биофизики РАН. С. 42-52.
145. Маевский Е.И., Гришина Е.В., Окон М.С., Кутышенко В.П. [1989]. Анаэробное образование сукцината и ресинтез АТФ в митохондриях тканей крыс. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. П/ ред. Л.Д. Лукьяновой. М. с.80-86.
146. Маевский Е.И., Розенфельд А.С., Гришина Е.В. [2000]. Экспериментальное доказательство преимущественного образования и окисления янтарной кислоты при гипоксии. Митохондрии, клетки и активные формы кислорода. Пушино, с.102-194.
147. Маевский Е.И., Розенфельд А.С., Гришина Е.В., Кондрашова М.Н. [2001а]. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий. Пушино. 155 с.
148. Маевский Е.И., Е.В. Гришина, А.С. Розенфельд, Л.А. Богданова, М.Н. Кондрашова. [2001 б]. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий. Приложение №14 к Российскому журналу гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии «Материалы XVI сессии Академической школы-семинара имени А.М. Уголева «Современные проблемы физиологии и патологии пищеварения», том XI, №4, стр. 22-28
149. Майзелик М.Я., Меерсон Ф.З., Лейкина Е.М. [1969]. Влияние тренировки к высотной гипоксии на интенсивность синтеза белка в головном мозгу и резистентность животных к судорожным факторам. БЭБМ. Т.69. N1.С.28-30.

150. Мазунин И. О, Н. В. Володько, Е. Б. Стариковская, Р. И. Сукерник. [2010]. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека. молекулярная биология. Молекулярная биология. том 44, No 5, с. 755–772
151. Мальшиев А.Л., Лукьянова Л.Д., Крапивин С.В. [1996]. Действие гипоксии нарастающей тяжести на ЭЭГ коры головного мозга крыс с разной резистентностью к острому дефициту кислорода // БЭБМ, №7, с. 262-275
152. Маргелис Л. [1983]. Роль симбиоза в эволюции клетки. — М.: Мир,. — 352 с.
153. Марков А.В. [2006]. Бактерии контролируют размножение и развитие животных Палеонтол. журн. №1. С. 1-11.
154. Марков А.В., И.А.Захаров. [2006]. Паразитическая бактерия Wolbachia и проблема происхождения эукариотической клетки. Палеонтол. журн. №1. С. 1-11. 2006 г.
155. Махновский В.П. [1999]. Прогностическая оценка и коррекция резистентности организма человека к высокогорной гипоксии. Бишкек, 213 С.
156. Меерсон Ф.З. [1973]. Общий механизм адаптации и профилактики. М. Наука. 360 с.
157. Меерсон Ф.З. [1984] Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических поражений сердца. // М.: Наука – 1984. – 269С.
158. Меерсон Ф.З. [1981]. Адаптация, стресс и профилактика. М. Наука. 270 с.
159. Меерсон Ф.З. [1986]. Адаптация к высотной гипоксии. М. Наука. 635 с.
160. Меерсон Ф.З. [1993]. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации, М. 331 с.
161. Меерсон Ф.З. [2009]. Общий механизм адаптации и профилактики. М.
162. Неговский В.А., Гурвич А.М., Золотокрылина Е.С. [1987]. Постреанимационная болезнь. М. «Медицина». 479 стр.
163. Нельсон Д., Кокс М. [2014]. Основы биохимии. том 2. Биоэнергетика и метаболизм. Пер с англ. М. Бином. 636 с
164. Новиков В.С. [1990]. Применение цитохрома С для нормализации нарушения резистентности. Цитохром С и его клиническое применение.: ЛНИИГиПК. С. 52-57.
165. Новиков В.С., Шустов Е.Б., Горанчук В.В. [1998]. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. СПб.: Наука; 541 с.
166. Оковитый С.В., Радько С.В. Применение сукцинатов в спорте.[2015]. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. №6. С. 59-65.
167. Оковитый С.В., Радько С.В., Шустов Е.Б. [2015]. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии. Хим.-фарм. журнал. 49(9) С.24-28.
168. Оковитый С.В., Суханов Д.С., Заплутанов В.А., Смагина А.Н. [2012]. Антигипоксанты в современной клинической практике. Клиническая медицина. 90(9). С.69-74.
169. Орлова Д.Д., Трибулович В.Г., Гарабаджигу А.В., Барлев Н.А., Мартин Ш. [2015]. Роль митохондриального морфогенеза в регуляции апоптоза. Цитология. Т.57. N3. 184-191
170. Павлик Л.Л., Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д., Миронова Г.Д. [2017]. Ультраструктурно-функциональные изменения в митохондриях коры головного мозга крыс с различной толерантностью к гипоксии при разных режимах гипоксических воздействий. БЭБМ. N9. С. 361-366.

171. *Пастушенков Л.В., Лесиовская Е.Е.* [1991]. Растения–антигипоксантаы (фитотерапия) СПб. 97с.
172. *Писаренко О.И., Хлопков В.Н., Рууге Э.К.* [1986]. Изучение методом ЯМР образования сукцината из экзогенных предшественников в неаэрируемых митохондриях сердца крысы. Биохимия. Т. 51. С. 1173-1179.
173. *Попова О.А., Замула С.В.* [1989]. Фармакологическая коррекция нарушений энергетического метаболизма миокарда при гипоксии. // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М, с.155-159.
174. *Розова Е.И., Маньковская И.Н. Миронова Г.Д.* [2015]. Структурно-динамические изменения в митохондриях миокарда крыс при острой гипоксической гипоксии: роль митохондриального АТФ-зависимого калиевого канал. Биохимия. Т.80. вып.8. С.1186-1194.
175. *Романова В.Е., Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д.* [1991]. Особенности окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс с различной резистентностью к кислородной недостаточности // БЭБМ, т.112, № 7, с. 49-51.
176. *Рэкер Э.* Биоэнергетические механизмы [1967]. М.Мир.
177. *Селиванов Е.А., Слепнева Л.В., Алексеева Н.Н., Хмылова Г.А., Герасимова М.Л.* [2006]. Эффективность применения фумарат-содержащих препаратов полифункционального действия в инфузионной терапии неотложных состояний // Вестник СПбГМА им. И.И.Мечникова. N2. с. 150-153.
178. *Самойлов М.О.* [1985]. Реакции нейронов мозга на гипоксию. Л.: Наука. 190 с.
179. *Самойлов М.О.* [1999]. Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. СПб. Ин-т физиологии им. И.П.Павлова РАН. 272 с.
180. *Самойлов М.О., Рыбникова Е.А.* [2012]. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды // Российский физиол. журн. им. И.М.Сеченова. Т. 98, № 1. С. 108-126.
181. *Самойлов М.О., Семенов Д.Г., Тюлькова Е.А. и др.* [2004]. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты. – Москва, Истоки. С. 96 – 112.
182. *Сапрунова В.Б.* [2008]. Ультраструктура митохондрий в условиях окислительного стресса. Дисс. Д.б.н. М
183. *Селиванов Е.А., Слепнева Л.В., Алексеева Н.Н., Хмылова Г.А., Герасимова М.Л.* [2012]. Фумаратсодержащие инфузионные растворы как средство выбора при оказании неотложной медицинской помощи // Журнал Медицина экстремальных ситуаций.. N1. с. 85-94.
184. *Серавин Л. Н.* [1986а]. Происхождение эукариотной клетки. I. Исторические истоки и современное состояние концепций симбиотического и аутогенного происхождения клетки // Цитология. Т. 28, № 6. С. 563-575.
185. *Серавин Л. Н.* [1986 б]. Происхождение эукариотной клетки. II. Критический анализ симбиотической (экзогенной) концепции // Цитология. Т. 28, № 7. С. 659-669.
186. *Серавин Л. Н.* [1986в]. Происхождение эукариотной клетки. III. Некоторые принципы морфо-функциональной организации клетки // Цитология. Т. 28, № 8. С. 779-789.
187. *Сиротинин Н.Н.* [1974]. Горы и здоровье. Киев: Наукова Думка. 203 с.
188. *Сиротинин Н.Н.* [1981]. Эволюция резистентности и реактивности организма. М. Медицина,. – 235 с.

189. Скулачев В.П. [1969]. Аккумуляция энергии в клетке. М. Наука.- 439 с.
190. Слепнева Л.В., Г.А. Хмылова. [2015]. Механизм повреждения энергетического обмена при гипоксии и возможные пути его коррекции фумарат-содержащими растворами Акушерство/Гинекология. Анестезиология/Реанимация. N 3(14) стр. 109-116
191. Биомедицинский Журнал Medline.ru
192. Смирнов Л.Д., Дюмаев К.М. [1982]. 3-оксипроизводные шестичленных азотистых гетероциклов. Синтез, ингибирующая активность и биологические свойства. Хим-фарм журнал; 16(4): 28-44.
193. Смирнов А.В., Аксенов И.В., Зайцева К.К. [1992]. Коррекция гипоксических и ишемических состояний с помощью антигипоксантов. Воен. Мед. Журн. 10. С. 36-40.
194. Смирнов А.В., Нестерова О.Б., Голубев Р.В. [2014]. Янтарная кислота и ее применение в медицине. Нефрология. 2014;4:12-24.,
195. Сологуб М.Ю., Кочетков С.Н., Темяков Д.Е. [2009]. Транскрипция и ее регуляция в митохондриях млекопитающих и человека. Молекуляр. биология. 43, 215–229.
196. Солодовникова И.М. [2007]. Морфофункциональные характеристики митохондрий кардиомиоцитов изолированных кусочков миокарда при инкубации в условиях гипоксии. Автор. дисс. к.б.н. М.
197. Софронов Г.А., Селиванов Е.А., Ханевич М.Д., Фадеев Р.В., Гипарович М.А., Юсифов С.А., Столяров И.К., Пшенкина Н.Н. [2011]. Использование инфузионных растворов в хирургии. Вестник Национ. Мед.-хирург. Центра им. Н.И. Пирогова. Т.6 № 1, 87-91.
198. Стрелков Р. Б., Чижов А. Я. [2001]. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации. 2. изд., испр. и доп. Екатеринбург. Урал. Рабочий. 396 с.
199. Стрелков Р.Б. [1997]. Перспективы применения метода прерывистой нормобарической гипоксической стимуляции (гипокситерапии) в медицинской практике. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. №6. С. 37-40.
200. Стрелков Р.Б., Брянцева Л.А., Зия А.В. [1994]. О возможности практического использования газовой гипоксической смеси для профилактики радиационных поражений. Радиобиология. 1974. Т.14.в.2.С. 117-120.
201. Труков А.И., Серов В.В. [1995]. Патологическая анатомия. // М.: Медицина. С. 688.
202. Суслина З.А., Варакин Ю.Я., Верещагин Н.В. [2006]. Сосудистые заболевания головного мозга. Эпидемиология. Основы профилактики. М. Медпресс-информ. 256 с.
203. Сухоруков В. С. [2011]. Очерки митохондриальной патологии. Москва: Медпрактика-М. 287 с.
204. Твердохлеб И. В. [1998]. Гетерогенность митохондриального аппарата миокарда и механизмы ее формирования в раннем онтогенезе крыс . Цитология и генетика.Т. 32, No 2. С. 8-12.
205. Фонсека М. де К., Агуйар К.Дж., Франко Ж.А. да Роча, Гинголд Р.Н, Лейте М.Ф. [2017]. GPR91: Расширение представлений о метаболитах цикла Кребса. Нефрология. Том 21. №1. 9-18.
206. Хазанов В.А., Панина О.П., Кобзева Е.А. [1989]. Ишемический каскад повреждений мозга и система окисления янтарной кислоты // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М, с.71-79.

207. *Хазен И.М., Кузнец Е.И.* [1958]. Физиология и патология дыхания, гипоксии и оксигенотерапии. Киев: АН УССР. С.60-67.
208. *Хватова Е.М., Шуматова Е.Н., Варыпаева И.С.* [1977]. Дефицит кислорода как фактор регуляции функционального состояния митохондрий // Митохондрии. - М.: Наука. - С. 32-37
209. *Хватова Е.М., Сидоркина А.Н., Миронова Г.В.* [1987]. Нуклеотиды мозга. Метаболизм и оценка при кислородном голодании.-М. Медицина. 205с.
210. *Хочачка П., Сомеро Дж.* [1988]. Биохимическая адаптация: Пер. с англ. М.: Мир. -568 с.
211. *Хундерякова Н.В., М.В. Захарченко, А.В. Захарченко, М.Н. Кондрашова.* [2008]. Гиперактивация сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови новорожденных крысят. Биохимия, том 73, вып. 3, с. 414 – 419
212. *Чарный А.М.* [1961]. Патофизиология гипоксических состояний. – М.: Мед. с.98
213. *Чернобаева Г.Н.* [1985]. Особенности регуляции окислительного метаболизма мозга животных с различной индивидуальной чувствительностью к кислородной недостаточности. Дисс. к.б.н.
214. *Чернобаева Г.Н., Белоусова В.В., Власова И.Г. Лукьянова Л.Д* [1993]. Биоэнергетические параметры мозга крыс с различной резистентностью к гипоксии. БЭБМ, т. 115, № 3, с251-254.
215. *Чернобаева Г.Н., Романова В.Е., Дудченко А.М., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д.* [1990]. Антигипоксические эффекты и механизмы действия некоторых производных 3-оксипиридина. Хим.-фарм.Ж. №8.- С. 26-38
216. *Чернобаева Г.Н., Романова В.Е. Лукьянова Л.Д.* [1995]. Влияние адаптации к периодической гипоксии на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крыс с различной резистентностью к кислородной недостаточности Бюлл. Экспер. биол. мед. т.120.- №12.- с. 572-575.
217. *Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Хананашвили Я.А. , Зеленская А.В., Нефедов Д.А. , Галенко-Ярошевский П.А.* [2016]. Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики и терапии различных заболеваний. Журнал фундаментальной медицины и биологии. № 3. С. 16-30.
218. *Шустов Е.Б., Оковитый С.В.* [2015]. Экс-орфанные рецепторы как мишени для потенциальных лекарственных средств. Биомедицина. 2:15-29.
219. *Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н.* [2013]. Обоснование направлений коррекции функционального состояния спортсменов исходя из методологии экстремальных состояний. Биомедицина. №3. С.26-35.
220. *Acker H.* [1994]. Cellular oxygen sensors. // Ann NY Acad Sci. N 718. P. 3–10.
221. *Acín-Peréz R., Fernández-Silva P., Peleato M.L., Pérez-Martos A, Enriquez J.A.* [2008]. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. Mol. Cell, 32, pp. 529–539
222. *Acín-Peréz R , Jose A. Enriquez J.E.* [2014]. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. (BBA) – Bioenergetics. Volume 1837, Issue 4, P. 444–450.
223. *Agani FH, Pichiule P, Chavez JC, La Manna JC.* [2000]. The role of Mitochondria in the regulation of Hypoxia-inducible Factor I Expression during Hypoxia. J Biol Chem; 275(46): pp 35863-67.
224. *Agani FH, Puchowicz M, Chavez J-C, Pichiule P, LaManna J.* [2002]. Inhibitors of mitochondrial complex I attenuate the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 during hypoxia in Hep3B cells. Compar. Biochemistry and Physiol; 132 (1): pp. 107-109.

225. Aguiar CJ, Rocha-Franco JA, Sousa PA [2014]. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Commun Signal*. 12(1):78.
226. Aithal HN, Ramasarma T. [1968]. Enhancement of liver succinate dehydrogenase during brief exposure of rats to low atmospheric pressure. *Indian J Exp Biol*; 6(3): pp.179-80.
227. Aithal HN, Ramasarma T. [1969] Activation of liver succinate dehydrogenase in rats exposed to hypobaric conditions. *Biochem J*; 115(1): pp. 77-83.
228. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. [1994]. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., NY, p. 678.
229. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. [2008]. *Molecular biology of the cell*, 5th edition. New York, Garland Science.
230. Alexander C., Votruba M., Perch U.E., Thiselton D.L., Mayer S., Moore A., Rodriguez M., Kellner U., Leo-Kottler B., Auburger G., Bhattacharya S.S., Wissinger B. [2000]. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet*. V. 26. No 2. P. 211–215.
231. Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Zorov DB. [1988]. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J. Cell Biol*.107:481–495.
232. Anesti V., Scorrano L. [2006]. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *BBA*; 1757:692–699.
233. Anju T.R., Abraham P.M., Antony S., Paulose C.S. [2010]. Alterations in cortical GABA_B receptors in neonatal rats exposed to hypoxic stress: role of glucose, oxygen, and epinephrine resuscitation. *Mol Cell Biochem*. V. 343, N 1. P. 1–11.
234. Appaix F, Kuznetsov AV, Usson Y, Kay L, Andrienko T, Olivares J, Kaambre T, Sikk P, Margreiter R, Saks V. [2003]. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp. Physiol*. 88:175–190.
235. Ariza AC, Deen PM, Robben JH. [2012]. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol* 2012;00022:1664–2392
236. Bakeeva L. E., Chentsov Yu. S., Jasaitis A. A., & Skulachev V. P. [1972]. The effect of oncotic pressure on heart muscle mitochondria. // *Biochim. Biophys. Acta*. V.275. P.319-332.
237. Bakeeva L. E., Chentsov Yu. S., Skulachev V. P. [1985]. Intermitochondrial contacts in myocardiocytes. // *J. Mol. Cell Cardiol*. V.15. P.413-420.
238. von Ballmoos C., Wiedenmann A., Dimroth P. [2009]. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem*. 78, 649–672
239. Bartoldk-Suki E., Imsirovic J., Nishibori Y., Krishnan R and Suki B. [2017]. Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors. *Int. J. Mol. Sci*. 18(8), 1812.
240. Bazan, S.; Mileykovskaya, E.; Mallampalli, V. K. P. S.; Heacock, P.; Sparagna, G. C.; Dowhan, W. [2012]. Cardiolipin-dependent Reconstitution of Respiratory Supercomplexes from Purified *Saccharomyces cerevisiae* Complexes III and IV. *Journal of Biological Chemistry* 288 (1): 401–411.
241. Belevich I., Verkhovsky M.I. [2008]. Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase. *Antioxid. Redox Signal*.10, 1–29.
242. Belosludtsev K. N., Dubinin M. V., Belosludtseva N. V. , and Mironova G. D. [2019]. Mitochondrial Ca²⁺ Transport: Mechanisms, Molecular Structures, and Role in Cells.

243. *Biochemistry* (Moscow), Vol. 84, No. 6, pp. 593-607.
244. *Benard G., Karbowski M.* [2009]. Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol.* V. 20. No. 3. P. 365-374.
245. *Beraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov AV, Ronot X, Tournear Y, Saks V.* [2009]. Mitochondrial dynamics in heart cells: Very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in HL-1 cells *J. Bioenerg. Biomem* V. 41, № 2, pp 195–214.
246. *Bereiter H. J., Mokawe G.* [1973]. Stoffwechselabhängige mitochondriale Bewegungen in epithelialen Kaulquappenherzzellen in Gewebekulturen. *Cytobiologie.* 6 : 447-467.
247. *Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E and Sharp F R* [2004]. Brain Genomic Response Following Hypoxia and Re-Oxygenation in the Neonatal Rat. Identification of Genes That Might Contribute to Hypoxia-Induced Ischemic Tolerance. *J Biol Chem*; 277: pp. 39728-39738.
248. *Biswas G., Adebajo O. A., Freedman B. D.* [1999]. Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO Journal*, vol. 18, no. 3, pp. 522–533.
249. *Boekema E.J., H.P. Braun,* [2007]. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system, *J. Biol. Chem.* 282. 1–4.
250. *Bolter B., Soll J.* [2001]. Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? *EMBO J.* V. 20. P. 935-940.
251. *Brandt, U.* [2006]. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 75:69-92.
252. *Briere J-J., Chretien D., Benit P., Rustin P.* [2004]. Respiratory chain defects: what do we know for sure about their consequences in vivo. *BBA.* 1659: 172-177.
253. *de Brito O.M., Scorrano L.* [2010]. An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum–mitochondria relationship. *The EMBO J.* 29, 2715-2723.
254. *Brunk U.T. and Terman A.* [2002]. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Eur. J. Biochem.* 269: 1996-2002.
255. *Butow R.A., Avadhani N.G.* [2004]. Mitochondria signaling. The retrograde response. *Molecular Cell.* 14(1): 1-15.
256. *Cagalinec M., Safiulina D., Liiv M., Liiv J., Choubey V., Wareski P., Veksler V., Kaasik A.* [2013]. Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. *J. Cell Sci.*, 126, 2187–2197.
257. *Capetanaki Y.* [2002]. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc. Med.*;12:339–348.
258. *Caprara C., Thiersch M., Lange C., Joly S., Samardzija M., Grimm C.* [2011]. HIF1a is essential for the development of the intermediate plexus of the retinal vasculature // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 52, N 5. P. 2109-2117.
259. *Cascarano J, Ades I.Z., O'Conner J.D.* [1976]. Hypoxia: a succinate-fumarate electron shuttle between peripheral cells and lung. *J Exp Zool.* 198(2): pp. 149-53.
260. *Carolyn M., Klinge.* [2008] Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis. *J Cell Biochem.* 15; 105(6): 1342–1351.
261. *Cavalier-Smith, T.* [1991]. The Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells. In *Fundamentals of Medical Cell Biology: Evolutionary Biology.* E. Edward Bittar (ed). London, JAI Press. 1:217-272.
262. *Chada, S. R. and Hollenbeck, P. J.* [2004]. Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr. Biol.* 14, 1272-1276.

263. Chaban Y., E. J. Boekema, N. V. Dudkina. [2014]. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation. Supercomplexes and mechanisms for their stabilization // *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1837, No 4. P. 418–426.
264. Chan D.C. [2006]. Mitochondrial fusion and fission in mammals. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* V. 22. No 10. P. 79–99.
265. Chan, D.C. [2012]. Fusion and fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* 46:265–287.
266. Chance, B. [1965]. Reaction of oxygen with respiratory chain in cells and tissues. *Journal Gen. Physiol.* V. 49. № 1. P. 163–188.
267. Chance B. [1988]. Early reduction of cytochrome c in hypoxia. *FEBS Lett.* V.226. P.343–345.
268. Chance B.M., Chance B. [1988]. Oxygen delivery to tissue: calculation of oxygen in the cardiac cell. // *Adv. Exp. Med. and Biol.* V.222. P.69–76.
269. Chance B., Hollunger G. [1961]. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of pyridine nucleotide // *J Biol Chem.* N 236. P. 1534–1543
270. Chance B., Quistorf F. B. [1977]. Study of tissue oxygen gradients by single and multiple indicators. *Adv. Exp. Med. Biol.* V.94. P.331–338.
271. Chance B., Sies H., Boveris A. [1979]. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Revs.* V.59. P.527–605.
272. Chance B, Williams GR. [1955a]. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* 217: № 1. P 383–395
273. Chance B. Williams GR et al. [1955b]. Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation V. a Mechanism for Oxidative Phosphorylation // *J. Biol. Chem.* Vol. 217, № 1. P. 439–452.
274. Chance B, Williams GR. [1956]. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol Relat Subj Biochem* 17: 65 – 134
275. Chandel, N. S. [2014]. Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol.* 12:34.
276. Chandel NS, Schumacker PT. [1999]. Cell depleted of mitochondrial DNA (p^o) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Letters.* 454: pp 173–176.
277. Chandel NS, Schumacker PT. [2000]. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Am Physiol* 88: pp. 1880–1889.
278. Chang C.R., Black stone C.[]. Cyclin AMP-depended protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. // *J. Biol. Chem.* V.282. P. 21583–21587.
279. Chavez JC, Agani F, Pichule P, LaManna JC [2000]. Expression of hypoxia-inducible factor – 1 α in the brain of rats during chronic hypoxia. *J Appl Physiol*; 89(5): pp. 1937–1942.
280. Chavez J.C., Pichiule P, Boero J., Arregui A. [1995]. Reduced mitochondrial respiration in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia. *Neurosci Lett*; 193: pp. 169–172.
281. Chen H., Chan D.C. [2005]. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet.* V.14. No 2. P. 283–289.
282. Chen H., Chan D. [2009]. Mitochondrial dynamics, fission, movement, and mitophagy – in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics*, V.18, R169–R176.
283. Chen H., Chomyn A., Chan D.C. [2005]. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* V. 280. No 28. P. 26185–26192.

284. *Chen, H., McCaffery, J. M., and Chan, D. C.* [2007]. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*. 130, 548–562.
285. *Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C.* [2010]. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*. 141, 280–289.
286. *Chen Q.* [1990]. Mitochondrial encephalomyopathy. Report of a case. *Chung Hua Shen Ching shen ko tsa chih*. V. 23. No 1. P.38–40.
287. *Chen Y.-C., Brown T.R., Russo J.* [2009]. Regulation of Energy Metabolism Pathways by Estrogens and Estrogenic Chemicals and Potential Implications in Obesity Associated with Increased Exposure to Endocrine Disruptors. *Biochim Biophys Acta*. 1793(7): 1128–1143.
288. *Chen Y., Liu Y., Dorn G.W.* [2011]. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. // *Circ. Res.*. V.109. No 12. P. 1327–1331.
289. *Chen, Y.-C., Taylor, E.B., Dephoure, N., Heo, J.-M., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, N.C., Gygi, S.P., and Rutter, J.* [2012]. Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab* 15, 348–360.
290. *Chouchani, ET, Pell, VR, Gaude, E, Aksentijević, D, Sundier, SY, Robb, EL, Logan, A, Nadtochiy, SM, Ord, ENJ, Smith, AC, Eyassu, F, Shirley, R, Hu, C-H, Dare, AJ, James, AM, Rogatti, S, Hartley, RC, Eaton, S, Costa, ASH, Brookes, PS, Davidson, SM, Duchon, MR, Saeb-Parsy, K, Shattock, MJ, Robinson, AJ, Work, LM, Frezza, C, Krieg, T, Murphy, MP.* [2014]. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 515(7527):431–435.
291. *Colca J.R., McDonald W.G., Waldon D.J., Leone J.W., Lull J.M., Bannow C.A., Lund E.T. Mathews W.R.* [2004]. Identification of a novel mitochondrial protein (“mitoNEET”) cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 286, E252–E260.
292. *Claypool S. M.* [2008]. Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane / S. M. Claypool, Y. Oktay, P. Boontheung // *J. Cell Biol.* —. — V. 182, № 5. — P. 937–950.
293. *Cogliati, S., C. Frezza, M.E. Soriano, T. Varanita, R. Quintana-Cabrera, M. Corrado, S. Cipolat, V. Costa, A. Casarin, L.C. Gomes, et al.* [2013]. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*. 155:160–171.
294. *Collins TJ, Bootman MD.* [2003]. Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells. *J. Exp. Biol.*;206:1993–2000.
295. *Conover, T.E., Ernster, L.* [1962]. DT diaphorase. II. Relation to respiratory chain of intact mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 58, 189–200.
296. *Conover, T.E., Ernster, L.* [1963]. DT diaphorase. IV. Coupling of extramitochondrial reduced pyridine nucleotide oxidation to mitochondrial respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 67, 268–280.
297. *Correa P. R., Kruglov E. A, Thompson M., Leite M. F., Dranoff J. A. and Nathanson M. H.* [2007]. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *Journal of Hepatology*; 47(2): pp. 262–269
298. *Cuddenback S.M., Yamaguchi H., Komatsu K., Miyashita., Yamada M., Wu C., Sing S., Wang H.G.* [2001]. Molecular cloning and characterization of Bif-1 – a novel homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J Biol Chem*. 276:20 559–20 565.

299. *Das J.* [2006]. The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *Bioessays*; 28(9): pp.890–901
300. *Da Silva M.M., Sartori A., Belisle E., Kowaltowsky A.J.* [2003]. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increase H_2O_2 release, and enhances K^+ transport. *Am.J Physiol Heart Circ. Physiol*; 285: pp.154-162.
301. *Daum B, Walter A, Horst A, Osiewacz HD, Kühlbrandt W,* [2013]. Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *PNAS* 110:15301–15306.
302. *De Duve C.* [1996a]. The Peroxisome in Retrospect. *Annals of the New York Academy of Sciences*. V. 804, Peroxisomes: Biology and Role in Toxicology and Disease. P. 1–10.
303. *De Duve C.* [1996b]. The birth of complex cell. *Scientific American*. P. 40-45.
304. *Deen PMT, Robben JH* (2011) Succinate receptors in the kidney. *Clin J Am Soc Nephrol* 22(8):1416–1422
305. *Dejours P.* [1962]. Chemoreceptors in breathing. *Physiol.Rev.* 42:335-358;
306. *Delettre, C., G. Lenaers, J.M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret.* [2000]. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26:207–210.
307. *De Vos K.J., Allan V.J., Grierson A.J., Sheetz M.P.* [2005]. Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. // *Curr. Biol.* V.15. No 7. P. 678–683.
308. *Devin A, Rigoulet M.* [2007]. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am J. Physiol Cell Physiol*; 292(1): pp. 52–58.
309. *Dienhart M. K.* [2008]. The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome bc1 COX supercomplex and the TIM23 machinery / M. K. Dienhart, R. A. Stuart // *Mol. Biol. Cell.* V. 19. – P. 3934–3943.
310. *Dikov D., Reichert A.S.* [2011]. How to split up: lessons from mitochondria. // *The EMBO Journal.* V.30. No 14. P. 2751–2753
311. *Di Lisa F, Ziegler M.* [2001]. Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD^+ metabolism. *FEBS Letters*; 492: pp. 4-8.
312. *Du J, Bruce McEwen, and Hussein K Manji.* [2009]. Glucocorticoid receptors modulate mitochondrial function. *Commun Integr Biol.* 2(4): 350–352.
313. *Duchen M.R.* [2004]. Roles of Mitochondria in Health and Disease. *Diabetes*. 53: pp. 96-102.
314. *Dudkina N. V., M. Kudryashev, H. Stahlberg, E. J. Boekema.* [2011]. Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 108.–P. 15196–15200
315. *Dzeja P.P., Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A.* [2002]. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:10156–10161.
316. *Elgass K.D., Smith E.A., LeGros M.A., Larabell C.A., Ryan M.T.* [2015]. Analysis of ER–mitochondria contacts using correlative fluorescence microscopy and soft X-ray tomography of mammalian cells. *J Cell Sci.* 128: 2795-2804.

317. Ely J. T. A., Krone C. A. [2000]. *A brief update on ubiquinone (coenzyme Q10)*. In: *J. Orthomolecular. Med. Band 15. P. 63–68*.
318. Ernster L., Ljunggren M., Danielson L. [1960]. Purification and some properties of of a hyghly dicumarol-sensitive liver diaphorase.- *Biochem. a Biophys.R. Communs.*- v.2.- p.48-57
319. Ernster, L., Navazio, F. [1958]. Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chem. Scand.* 12, 595.
320. Ernster L., Schatz G. [1981]. Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* T.91. No 3. C. 227-255
321. Fan J., Cai H., Yang S., Yan L., Tan W. [2008]. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells // *Comp Biochem Physiol – Part B: Biochem Mol Biol.* V. 151, N 2. P. 153-158.
322. Fedotcheva NI, Sokolov AP, Kondrashova MN. [2006]. Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006;41:56–64.
323. Feldkamp T, Kribben A, Roeser NF, Senter RA, Kemner S, Venkatachalam MA, Nissim I, Weinberg JM. [2004]. Preservation of complex I function during hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial injury in proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286(4): pp.749-59.
324. Felty Q., Roy D. [2005]. Estrogen, mitochondrea, and growth of cancer non cancer cells. *J. of Carcinogenesis.* 4:1, 1-34.
325. Ferguson S.M., De Camilli P. [2012]. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol cell boil.* V. 13. No 2. P. 75-88.
326. Fernandez-Moran H. [1962]. Cell-membrane ultrastructure low-temperature electron microscopy and X-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. *Circulations.* V.26. No.2. P. 1039 -1045.
327. Fernández-Silva P., Erika Fernández-Vizarra, José Antonio Enríquez. [2013]. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain // *Science.* V. 340. P. 1567–1570.
328. Fiermonte G., Dolce V., Arrigoni R., Runswick M.J., Walker J.E., Palmieri F. [1999]. Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem J.* N 344. P. 953–960.
329. Fletcher D.A., Mullins, R.D. [2010]. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 463. 485–492.
330. Flippo K.H., Strack S. [2017]. Mitochondrial dynamics in neuronal injury, development and plasticity. *J Cell Sci.* 130: 671-681.
331. Frazier A.E., Kiu C., Stojanovski D., Hoogenraad N.J., Ryan M.T. [2006]. Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. // *Biological Chemistry..* V. 387. No 12. P. 1551–1558.
332. Friedman J.R., Lackner L.L., West M., DiBenedetto J.R., Nunnari J., Voeltz G.K. [2011]. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science.* V.334. No 6054. P. 358–362.
333. Gandre-Babbe S., Van der Bliek A.M. [2008]. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* V. 19. No 6. P. 2402-2412.
334. Gellerich F.N. [2009]. Mitochondria and Energetic Depression in Cell Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 10(5): 2252–2303.

335. Genova M.L., C. Casteluccio, R. Fato, G. Parenti-Castelli, M. Merlo-Pich, G. Formiggini, C. Bovina, M. Marchetti, G. Lenaz. [1995]. Major changes in Complex I activity in mitochondria from aged rats may not be detected by direct assay of NADH-coenzymeQ reductase. *Biochem. J.* 311: pp. 105-109.
336. Genova M.L., Lenaz G. [2011]. New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria, *Biofactors* 37. 330–354.
337. Genova M.L., Lenaz G. [2013]. A critical appraisal of the role of respiratory supercomplexes in mitochondria, *Biol. Chem.* 394. 631–639.
338. Genova M.L., Lenaz G. [2014]. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *BBA.* 1837. 427–443
339. Giacomello M., Drago I., Bortolozzi M., Scorzeto M., Gianelle A., Pizzo P., Pozzan T. [2010]. Ca^{2+} hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca^{2+} mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Mol. Cell.* 38. 280–290.
340. Giedt R.J., Pfeiffer D.R., Matzavinos A., Kao, C.Y., Alevriadou B.R. [2012]. Mitochondrial dynamics and motility inside living vascular endothelial cells: Role of bioenergetics. *Ann. Biomed. Eng.* 40. 1903–1916.
341. Giorgi C., De Stefani D., Bononi A., Rizzuto R., Pinton P. [2009]. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Intern J Biochem Cell Biol.* V. 41 (10);1817-1827.
342. Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszyński, J., Wieckowski, M.R., and Pinton, P. [2015] Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxid. Redox. Signal.* 22. 995–1019.
343. Gnaiger E. *Mitochondrial Physiology*. [2005]. The many Faces and functions of on organelle. MiP. Austria. P 151.
344. Gnaiger E.G, Mendez G., Hand SC. [2000]. High phosphorylation efficiency in mitochondria under hypoxia. *Pro.Natl.Acad. Sci. USA*; 97: pp.11080-11085
345. Goldberg N.D., Janet V.P. [1966]. Effects of changes in brain acid cycle intermediates. *The Journal of Biochemical Chemistry.* V. 241, N 17. P. 3997-4003.
346. Grai MW, Burger G, Lang BF. [1999]. Mitochondrion evolution, *Science*; 283: pp. 1467-1481.
347. Green D., Baum H. [1969]. Energy and the mitochondrion. New-York -London: Academic Press.
348. Green D., Tzagoloff A. [1966]. The mitochondrial electron transfer chain // *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 116, № 1. P. 293–304.
349. Gu J., Wu M., Guo R., Yan K., Lei J., Gao N., et al. [2016]. The architecture of the mammalian respirasome. *Nature.* 537, 639–643.
350. Gunter T.E., Yule D.I., Gunter K.K., Eliseev R.A., Salter J.D. [2004]. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett.* V. 567. No. 1. P.96-102
351. Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., and Yang, M. [2017]. Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I2III2IV2. *Cell* 170, 1247–1257.
352. Gusy RD, Schumacker PT. [2006]. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased ROS during Hypoxia. *Exper Physiol*; 91 (5): pp. 807-819.
353. Hackenbrock C.R., Caplan A.S. [1969]. Ion Induced Ultrastructural Transformations in Isolated Mitochondria. *Cell Biol.* V.42. P.221-233.
354. Hackenbrock C.R., Miller K.J. [1975]. The distribution of anionic sites on the surface of mitochondrial membrane. *J.Cell Biol.* V.65. P.615-630.

355. Hackenbrock C.R., Chazotte B., Gupte S.S. [1986]. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18. pp. 331-368.
356. Hakak Y, Lehmann-Bruinsma K, Phillips S [2009]. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 85:837–843.
357. Hamberger A., Hyden H. [1963]. Increase enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J.Cell.Biol.* V.16. P.521-526.
358. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honore J.-C., Noueihed B., Zhou T., Nadeau-Vallee M., Hou X., Lavoie J.C., Mitchell G., Mammer O.A., Chentob S. [2014]. G-protein–coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – V. 34, N 2. – P. 285-293.
359. Harris P., Castill J., Gibson K. et al. [1970]. Succinic and lactic dehydrogenase activity in myocardial homogenates from animals at high and low altitude. *J.Mol.Cell. Cardiol.* V.I P.189-195.
360. Hatefi Y. [1985]. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1015–1069.
361. He W, Miao F.J, Lin D.C.O [2004]. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan-G-protein-coupled receptors. *Nature*; 429 (6988): pp.188-193.
362. Heggeness MH, Simon M, Singer SJ. [1978]. Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:3863–3866.
363. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honore J.-C., Noueihed B., Zhou T., Nadeau-Vallee M., Hou X., Lavoie J.C., Mitchell G., Mammer O.A., Chentob S. [2014]. G-protein–coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* V. 34, N 2. P. 285-293.
364. Hems D., Brosnan J. [1970]. Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. *Biochem. J.* V. 120, N 1. P. 105–111.
365. Hermann M, Kuznetsov A, Maglione M, Smigelskaite J, Margreiter R, Troppmair J. [2008]. Cytoplasmic signaling in the control of mitochondrial uproar? *Cell Commun. Signal.* 6:4.
366. Hewitson KS, Lienard BM, McDonough MA, Clifton IJ., Butler D., Soares AS, Oldham NJ, McNeill LA, Schofield CJ [2007]. Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates, *J Biol Chem*; 282(5): pp.3293-301
367. Hochachka P.W. [1986]. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science.* V.231. P.234-241.
368. Hochachka P.W., Buck L.T., Doll C.J., Land S.C. [1996]. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, N 18. P. 9493-9498.
369. Hochachka, P. and Dressendorfer, R. [1976]. Succinate accumulation in man during exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 35, 235–242.
370. Hohl C., Oestreich R., Rosen P., Wiesner R., Grieshaber M. [1987]. Evidence for succinate production by reduction of fumarate during hypoxia in isolated adult rat heart cells // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* V. 259, N 2. – P. 527-535.
371. Hollenbeck P.J., Saxton W.M.[2005]. The axonal transport of mitochondria. *J of Cell Science.* 118: 5411-5419.
372. Hu, J., Wu, Q., Li, T., Chen, Y., and Wang, S. [2013]. Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. *Exp Eye Res.* 109:31–39.

373. Hu J, Li T, Chen Y, Wang S, Xiong F, Wu Q. [2015]. The MAPK signaling pathway mediates the GPR91-dependent release of VEGF from RGC-5 cells. *Int J Mol Med*. 36(1):130–138.
374. Hunte C., Palsdottir H., Trumpower B.L. [2003]. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc₁ complex. *FEBS Lett*. 12, 39–46.
375. Ingeman E., Perkins E.M., Marino M., Mears J.A., McCaffery J.M., Hinshaw J.E. Nunnari J. [2005]. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. // *J. Cell Biol.*. V. 170. No 7. P. 1021–1027.
376. Intermittent Hypoxia. From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. [2010]. Eds: Lei Xi, Tatiana V. Serebrovskaya. Nova Sci publishers, N-Y. USA. Intermittent Hypoxia and Human Diseases. [2012]. Eds: Lei Xi, Tatiana V. Serebrovskaya. Springer, 2010–2011.
377. Jang S. and Javadov S. [2018]. Current Challenges in Elucidating Respiratory Supercomplexes in Mitochondria: Methodological Obstacles. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00238>
378. Jayaraman J, Joshi V.C., Ramasarma T. [1963]. Some aspects of the metabolism of Coenzyme Q in the rat. *Biochem.J.* 88. P. 369–373
379. Jones D.P. [1984]. Effect of mitochondrial clustering on O₂ supply in hepatocytes. *Am. J Physiol.* V.247. P.c83–c89.
380. Jones D.P. [1985]. The role of oxygen concentration in oxidative stress: Hypoxic and hyperoxic models. // *Oxidative stress.*, ed: Siess H.- Acad.Press., London, New York, Tokyo.-. P.152–195.
381. Jones D.P. [1986]. Intracellular diffusion gradients of pO₂ and ATP. *Am.J.Physiol. Cell Physiol.* 19. V.250. P.663–675.
382. Jones D.P., Aw T.Y., Sillan A.H. [1990]. Defining the resistance to oxygen transfer in tissue hypoxia. *Experientia*. V.46. P. 1180–1185
383. Jones D.P., Kennedy F.G. [1986]. Analysis of intracellular oxygenation of isolated adult cardiac myocytes. // *Am.J.Physiol.* V.250.P.c384–390.
384. Jones D.P., Mason H.S. [1978]. Gradients of oxygen concentration in hepatocytes. *Biol.Chem.* V.253. P.4874–4880.
385. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. [2001]. Energetic crosstalk between organelles: Architectural integration of energy production and utilization. *Circ. Res.* 89:153–159.
386. Kann O., Kovacs R. *Mitochondria and neuronal activity* [2007]. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* –V. 292, N 2. P. 641–657.
387. Karbowski M, Youle R.J. [2003]. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10:870–880
388. Keilin D., E.F. Hartree. [1947]. Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations *Biochem. J.*, 41, pp. 500–502
389. Kimberg D.V., Loeb J.N. [1972]. Effects of cortisone administration on rat liver mitochondria. Support for the concept of mitochondrial fusion. // *J. Cell Biol.* V. 55. No 3. P. 635–643
390. Kim C-H, Cho Y-S, Chun Y-S [2002]. Early expression of myocardial HIF-1 α in response to mechanical stress. *Circ Res*; 90: pp. 625–637.
391. King A, Selak MA, Gottlieb E [2006]. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*; 25(34): pp.4675–82.
392. Kirova Yu.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. [2014]. The role of oxidative stress in the induction of transcription factors at different stages of adaptation to hypoxia

// Adaptation Biology and Medicine. New Challenges. Eds L.M. Popescu, A.R. Hargens, P.K. Singal. – New Delhi, India: Narosa Publishing House. V. 7. P. 261-277.

393. *Klinge C.M.* [2008]. Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis. *J Cell Biochem.* 15; 105(6): 1342–1351.

394. *Klinge C.M. and Jose Russo J.* [2009]. Regulation of Energy Metabolism Pathways by Estrogens and Estrogenic Chemicals and Potential Implications in Obesity Associated with Increased Exposure to Endocrine Disruptors. *Biochim Biophys Acta.* 1793(7): 1128–1143.

395. *Klug H.* [1974]. An extensive vacuolar system in the nuclei of malignant metanoma cells. *Acad. Sci. Hung.* V.22. P.321-326.

396. *Knauf F, Rogina B, Jiang Z Aronson PS, Helfand SL.* [2002]. Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the lifeextending gene *Indy*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14315–14319.

397. *Kolvunen P, Hirsila M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J.* [2007]. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydrolases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem.* 282(7): 4524-32

398. *Komaromy-Hiller G., Sundquist P., Jacobsen L., Nuttall K.* [1997]. Serum succinate by capillary zone electrophoresis: marker candidate for hypoxia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1997. V. 27, N 2. – P. 163-168.

399. *Kondrashova M N* [1993]. The formation and utilization of succinate in mitochondria as a control mechanism of energization and energy state of tissue. In: Chance B. (Ed.). *Biological and Biochemical Oscillators*, Academic Press. New York, NY: pp. 373-397.

400. *Kondrashova MN.* [1989]. Structural-kinetics organization of tricarboxylic acid cycle under active functioning of tissues. *Biophysics.* 34:450–8.

401. *Kondrashova M.N., Doliba N.M.* [1989]. Polarografic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine. *FEBS Lett.* 243: pp.153-155.

402. *Kondrashova MN, Volkova SP, Kuznetsov IV, Grigorenko EV, Babsky AM, Podoletz A,* [1991]. Succinic acid as a physiological signal molecule. In: Winlow W, Vinogradova OS, Sakharov DA, editors. *Signal Molecule and Behavior*. Manchester, NY: Manchester University Press p. 295–300.

403. *Krebs HA.* [1970]. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect Biol Med.* 14:154–170

404. *Kubli D.A., Gustafsson A.B.* [2012]. Mitochondria and Mitophagy. *Circulation Research.* 111:1208-1221.

405. *Kühlbrandt W.* [2015]. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 13: 89.

406. *Kühlbrandt W., Davies K.M.* [2016]. Rotary ATPases: a new twist to an ancient machine. *Trends Biochem Sci.* V. 41. N. 1. P. 106–116.

407. *Kunz W.S. Kudin A.P., Vielhaber S., Blumke I., and all.* [2000]. Mitochondrial complex I deficiency in epileptic focus of patients with temporal lode epilepsy. *Ann. Neurol.* 48: pp.766-773.

408. *Kurhaliuk N.M., Serebrovs'ka T.V., Koliesnikova I.E.* [2002]. Regulation of oxidative phosphorylation by liver mitochondria receptors after adaptation by rats to periodic normal pressure and acute hypoxia. *Ukr Biokhim Zh.* 74(6): pp. 114-9.

409. Kushnir M.M., Komaromy-Hiller G., Shushan B., Urry F.M., Roberts W.L. [2001]. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. *Clin. Chem.* V. 47, N 11. P. 1993–2002.
410. Kuznetsov A.V., Javadov S., Guzun R., Grimm M., Saks V. [2013]. Cytoskeleton and regulation of mitochondrial function: The role of beta-tubulin II. *Front. Physiol.*, 4, 82.
411. Kuznetsov A.V., Hermann M., Saks V., Hengster P., Margreiter R. [2009]. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int. J. Biochem Cell Biol.* V. 41. No 10. P. 1928–1939.
412. Kuznetsov A.V., Margreiter R. [2009]. Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity. *Int J Mol Sci.*; 10(4): 1911–1929.
413. Kuznetsov A.V., Mayboroda O., Kunz D., Winkler K., Schubert W., Kunz W.S. [1998]. Functional imaging of mitochondria in saponin-permeabilized mice muscle fibers. *J. Cell Biol.*; 140:1091–1099.
414. Kuznetsov A.V., Schneeberger S., Seiler R., Brandacher G., Mark W., Steurer W., Saks V., Usson Y, Margreiter R, Gnaiger E. [2004a]. Mitochondria: defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *Am J Heart Circ Physiol.* 286: H1633-H1641.
415. Kuznetsov A.V., Usson Y, Leverve X, Margreiter R. [2004b]. Subcellular heterogeneity of mitochondrial function and dysfunction: evidence obtained by confocal imaging. *Mol Cell Biochem.* 256–257:359–365.
416. Labbé, K., Murley A, Nunnari J. [2014]. Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:357–391.
417. Lang B.F., Seif E., Gray M.W., O’Kelly C.J., Burger G. [1999]. A comparative genomics approach to the evolution of eukaryotes and their mitochondria. *The Journal of Eukaryotic Microbiology.* V.46, N 4. P.320–326.
418. Langford G. M. [2002]. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3, 859–865.
419. LaNoue K.F., Schoolwerth A.C. [1979]. Metabolite transport in mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* N 48. P. 871–922.
420. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A., Colás C., Balsa E. Perales-Clemente E., Quirós P.M., Calvo E., Rodríguez-Hernández M. A., Navas P., Cru R, Carracedo A., López-Otín C., Pérez-Martos A., Fernández-Silva P., Fernández-Vizarra E., Enríquez J.A. [2013]. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain // *Science.* V. 340. P. 1567–1570.
421. Leist M, Single B, Castoldi A.F., Kuhnle S, Nicotera P. [1997]. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185:1481–1486.
422. Legros F., Lombes A., Frachon P., Rojo M. [2002]. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. // *Mol. Biol. Cell.* V. 13. No 12. P. 4343–4354.
423. Lehninger A.L. [1951]. Phosphorylation coupled to oxidation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide.- *J. Biol. Chem.*.-v. 190.p. 345–359.
424. Lemasters J.J. [2014]. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biology* 2:749–754.
425. Lemesko V. V. [2002]. Model of the outer membrane potential generation by the inner membrane of mitochondria. // *Biophys J.* V. 82. P. 684–692.

426. *Lenaz G., Genova M.L.* [2010]. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 961–1008.
427. *Lenaz G., Tioli G, Falasca A.I., Genova M.L.* [2018]. Coenzyme Q and respiratory supercomplexes: physiological and pathological implications. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali.* V. 29, Issue 2, pp 383–395.
428. *Li YH, Woo SH, Choi DH, Cho EH* [2015]. Succinate causes a-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 463:853–858.
429. *Liesa M., Palacín M., Zorzano A.* [2009]. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol. Rev.* V. 89, № 3. P. 799–845
430. *Ligon L. A., Tokito M., Finkelstein J. M., Grossman F. E. and Holzbaur E. L.* [2004]. A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity. *J. Biol. Chem.* 279. 19201-19208.
431. *Livanova L., Sarkisova K., Lukyanova L.D.* [1992]. Respiration and oxidative phosphorylation of the mitochondria of the brain of the rats with various types of behavior. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 2., №: 6, pp. 519-525.
432. *Lopez-Borneo J.,* [2003]. Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol* 13:493-499;
433. *Loson O.C., Song Z., Chen H., Chan D.C.* [2013]. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. // *Mol Biol Cell.* V. 24. No5. P.659-667.
434. *Lukyanova L.D.* [1988]. Limiting steps of energy metabolism in brain in hypoxia // *Neurochem. Intern.* V.13, S.I, pp. 146-147.
435. *Lukyanova L.* [1997]. Molecular, metabolic and functional mechanisms of individual resistance to hypoxia. In: *Adaptation Biology and Medicine*, Sharma B.K., Takeda N., Singal P.K (eds), Narosa Publishing House New Dehli, India. p. 261-272.
436. *Lukyanova L.D.* [2002]. Cellular mechanism responsible for beneficial effects of hypoxic therapy. In: *Adaptation Biology and Medicine*, Moravec, et al. (eds), Narosa Publishing House New Dehli., India; 3: pp. 290-303.
437. *Lukyanova L.D.* [2004]. Novel approaches to the understanding of molecular mechanisms of adaptation. In: *Adaptation Biology and Medicine*. Hargens A., Takeda N., Singal P.K.(eds). 4: pp. 11- 22.
438. *Lukyanova L.D.* [2013]. Mitochondrial signaling in hypoxia // *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases.* – 2013. – V. 3, N 2. – P. 20-32.
439. *Lukyanova L.D.* [2014]. Mitochondria signaling in adaptation to hypoxia // *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* N 5. P. 363–381.
440. *Lukyanova L.D., Dudchenko A.M.* [1999]. Regulatory role of the adenylate pool in the formation of hepatocyte resistance to hypoxia. In: *Adaptation Biology and Medicine*, K.B. Pandolf, N. Takeda, P.K. Singal (eds.), Narosa Publishing House New Dehli, India; 2: pp. 139-150.
441. *Lukyanova, L.D., Dudchenko, A.V., Tsybina, TA., Germanova, E.L., and Tkatchuk, E.N.* [2008]. “Mitochondrial signaling in adaptation to hypoxia,” in *The Adaptation Biology and Medicine*, ed. L. Lukyanova, P. Singal, N. Takeda (New Dehli: Narosa Publ. House), 5-15.
442. *Lukyanova LD, Dudchenko AM, Germanova EL, Tsybina TA, Kapaladse RA, Ehrenbourg IV, Tkatchouk EN.* [2010]. Mitochondria signaling in formation of body

resistance to hypoxia. In: Intermittent Hypoxia: from molecular mechanisms to clinical applications. Eds. Lei Xi & Serebrovskaya T, Chapter 20, 423-450. Nova Science Publishers. New York. USA.

443. *Lukyanova L.D., Kirova Yu. I., Germanova E. L.* [2012]. Energotropic Effects of Intermittent Hypoxia: Role of Succinate-Dependent Signaling. In: Intermittent Hypoxia and Human Diseases. Eds. L. Xi, T.V. Serebrovskaya (eds). Springer-Verlag London. P. 239-252.

444. *Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kirova Yu.I.* [2011]. The signal function of succinate and free radicals in mechanisms of preconditioning and long-term adaptation to hypoxia. In: Adaptation Biology and Medicine (Volume 6: Cell Adaptations and Challenges). Eds: P. Wang, C.-H. Kuo, N. Takeda and P.K. Singal, Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India. V. 6. P. 251–277.

445. *Lukyanova L.D., Kirova Y.I.* [2015]. Mitochondria-controlled succinate-dependent signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. In: Brain hypoxia and ischemia: new insights into neurodegeneration and neuroprotection. Review article. Front. Neurosci. V.9. Article 320. P.1-15.

446. *Lukyanova L.D., Kirova Yu.I., Sukoyan G.V., Germanova E.L.* [2014]. Role of HIF-1 α in signaling mechanisms of urgent and long-term adaptation in different regimens of hypoxic training // Adaptation Biology and Medicine. New Challenges / Eds L.M. Popescu, A.R. Hargens, P.K. Singal. – New Delhi, India: Narosa Publishing House. V. 7. P. 279-305.

447. *Lukyanova L., Tkatchouk E.N., Monakov M.Yu., Germanova E. L., Ehrenbourg I.V.* [2003]. Formation of compensatory bioenergetic mechanisms in the brain cortex during adaptation to intermittent normobaric hypoxia. prognostic value and correlation with other functional parameters. Hypoxia Med; 10 (3-4): pp.23-25.

448. *Lutz PL, Prentice H M,* [2002]. Sensing and Responding to Hypoxia Molecular and Physiological Mechanisms. Integrative and Comparative Biology; 42(3): pp. 463-468.

449. *Lyamsaev K.G., Tokarchuk A.V., Panteleeva A.A., Mulkidjanian A.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V.* [2018]. Induction of autophagy by depolarization of mitochondria. Autophagy. /doi.org/10.1080/15548627.2018.1436937

450. *MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, Watson DG, Gottlieb E.* [2007]. Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. Mol Cell Biol; 27(9): pp.3282-9.

451. *Maklashinas E, Sher E., Zhou H-Z., Gray M. and al.* [2002]. Effect of anoxia/reperfusion on the reversible active/deactive transition of complex I in rat hear. BBA – Bioenergetics; 1556(1): pp. 6-12.

452. *Maranzana, E.; Barbero, G.; Falasca, A.I.; Lenaz, G.; Genova, M. L.* [2013]. Mitochondrial respiratory supercomplexes association limits production of reactive oxygen species from Complex I. Antioxid Redox Signal 19: 1469 – 1480

453. *Martinvalet D.* [2018]. The role of the mitochondria and the endoplasmic reticulum contact sites in the development of the immune responses. Cell Death Dis. 28;9(3):336.

454. *McBride, H. M., Neuspiel, M. and Wasiak, S.* [2006]. Mitochondria: more than just a powerhouse. Curr. Biol. 16. R551–R560.t P

455. *Maevsky EI, Guzar IB, Rosenfeld AS, Kondrashova MN* [1982]. Does Succinic Acid Mediate adrenalin Stimulation in Mitochondria? EBEC Reports. Lyon: LBTM-CNRS

456. *Marchi S, Pinton P [2014].* The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *J Physiology.* 592 (5): 829–39. crino Mtabolism
457. *Margulis, L. [1971].* Symbiosis and evolution, *Sci. Am.* 225, 48–57.
458. *Mela L., Goodwin C.W., Miller L.D. [1976].* In vivo control of mitochondrial enzyme concentrations and activity by oxygen. *Am. J. Physiol.*, 231: 1811-1816.
459. *Mendez M.G., Restle D., Janmey P.A. [2014].* Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophys. J.*, 107, 314–323.
460. *McBride, H. M., Neuspiel, M. and Wasiak, S. [2006].* Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 16. R551–R560.
461. *McDonald M J. [2002].* Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *BBA*; 1619: pp.7-88.
462. *Michiels K. [2004].* Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am. J. Pathology*; 164: pp. 1875-1882.
463. *Milenkovic, D., Blaza, J. N., Larsson, N.-G., and Hirst, J. [2017].* The Enigma of the respiratory chain supercomplex. *Cell Metab.* 25, 765–776.
464. *Millar A. H., A. E. Trend, J. L. Heazlewood. [2004].* Changes in the mitochondrial proteome during the anoxia to air transition in rice focus around cytochrome-containing respiratory complexes. *J. Biol. Chem.* V. 279, № 38. P. 39471–39478.
465. *Mishra, P. and Chan, D. C. [2014].* Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 634-646.
466. *Mishra P, Chan D.C. [2016]* Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Investig Med.* V. 212, No. 4: 379.
467. *Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., Chan, D.C. [2014].* Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 19, 630–641.
468. *Mitchell, P. [1961].* Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature.* 191 (4784): 144–148.
469. *Mitra, K. [2013].* Mitochondrial fission-fusion as an emerging key regulator of cell proliferation and differentiation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*35, 955-964
470. *Mironov SL. [2007].* ADP regulates movements of mitochondria in neurons. *Biophys. J.*;92:2944–2952.
471. *Mironov SL, Symonchuk N. [2006].* ER vesicles and mitochondria move and communicate at synapses. *J. Cell Sci.*;119:4926–4934.
472. *Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. [1977].* Activation of the external pathway of the NADN oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. *Biochem, and biophys. acta.*v.501. p.415-423
473. *Mose-Larsen P, Bravo R, Fey SJ, Small JV, Celis JE. [1982].* Putative association of mitochondria with a subpopulation of intermediate-sized filaments in cultured human skin fibroblasts. *Cell.*31:681–692.
474. *Moser C.C., Farid T.A., Chobot S.E., Dutton P.L. [2006].* Electron tunneling chains of mitochondria. *BBA.* 1757, 1096–1109.
475. *Murphy E. [2004].* Primary and Secondary Signaling Pathways in Early Preconditioning That Converge on the Mitochondria to Produce Cardioprotection. *Circulation*; 94: pp. 7-16.
476. *Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. [1986]* Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*; 74: 1124-1136.

477. Mourier, A., E. Motori, T. Brandt, M. Lagouge, I. Atanasov, A. Galinier, G. Rappl, S. Brodesser, K. Hultenby, C. Dieterich, and N.G. Larsson. [2015]. Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *J. Cell Biol.* 208:429–442.
478. Nakamura N., Kimura Y., Tokuda M., Honda S., Hirose S. [2006]. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* V. 7. No 10. P. 1019–1022.
479. Naldini A., Carraro F. [2005]. Role of inflammatory mediators in angiogenesis // *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* N 4, N 1. P. 3–8.
480. Napolitano M, Centoze D, Gubellini P, Rossi S., Spiezia S, Bernardi G, Gulino A, Calabresi P. [2004]. Inhibition of mitochondrial complex II alters strial expression of genes involved in glutamatergi signaling: possible implications for Hugintons disease. *Neurobiol Dis*; 15(2): pp. 407-414
481. Nichols D G, Samantha L B. [2000]. Mitochondria and Neuronal Survival. *Physiol Rev*; 80(1): pp. 315-360.
482. Nishimura G, Proske R Jm, Doyama H, Higuchi M. [2001]. Regulation of apoptosis by respiratory substrates. *FEBS Letters*; 505(3): pp. 399-404.
483. Obrenovitch T.P. [2008]. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol rev.* V. 88, N 1. P. 211–247.
484. Olichon, A., Guillou, E., Delettre, C., Landes, T., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L. J., [2006]. Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763, 500–509.
485. Ong S.B., Hausenloy D.J. [2010]. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 88:16–29.
486. Ono T, Isobe K., Nakada K., Hayashi J.I. [2001]. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. // *Nature Genetics.* V. 28. No 3. P. 272–275.
487. Orrenius S., Packer L., Cadenas E. [2012]. Mitochondrial signaling in health and disease. CRC Press, Taylor Francis Group. 300 p
488. Osellame L.D., Blacker T.S., Duchon M.R. [2012]. *Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* V. 26, Issue 6, P. 711-723.
489. Oshino N., Jamieson D., Chance B. [1975]. The properties of hydrogen peroxide production under hyperoxic and hypoxic conditions of perfused rat liver. *Biochem.J.* V.146. P.53-65.
490. Oswald S., Grube M., Siegmund W., Kroemer H.K. [2007]. Transporter-mediated uptake into cellular compartments. *Xenobiotica.* V. 37, N 10. P. 1171–1195.
491. Otera H. Ishihara N., Mihara K. [2013]. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. (*BBA*) – *Molecular Cell Research*, V1833, Issue 5, P. 1256-1268.
492. Ou L.C., Sardella G.L., Hill N.S., Tenney S.M. [1986]. Acute and chronic pulmonary pressor responses to hypoxia: the role of blunting in acclimatization. *Respir. Physiol.* 64. 81–91
493. Paddenbergh R, Ishak B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, Braun – Dullaues R, Kummer W. [2003]. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 284: pp. 1710-1719.

494. *Palade G.A.* [1956]. Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures. In *Enzymes: units of biological structure and function*. New-York: Acad. Press, Inc. P.181-215.
495. *Palmer, C. S., Osellame, L. D., Laine, D., Koutsopoulos, O. S., Frazier, A. E., and Ryan, M. T.* [2011]. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep.* 12, 565–573.
496. *Park, M.K.; Ashby, M.C.; Erdemli, G.; Petersen, O.H.; Tepikin, A.V.* [2001]. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J.* 20. 1863-1874.
497. *Park J., Chen Y., Tishkoff D.X., Peng C., Tan M., Dai L., Xie Z., Zhang Y., Zwaans B.M.M., Skinner M.E., Lombard D.B., Zhao Y.* [2013]. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol. Cell.* V. 50, N 6. P. 919–930.
498. *Parone P.A., Da Crus S., Tondera D., Mattenberger Y., James D.I. Maechler P. Barja F. Martinou J.C.* [2008]. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One.* V. 3. No 9. P. 3257.
499. *Picard M., Hepple R.T, Burelle Y.* [2012]. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am J Physiol Cell Physiol.* V. 302. No 4. P. 629-641.
500. *Peers Ch., Kemp P.J.* [2001]. Acute oxygen sensing: diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors. *Respiratory Reseach;* 2(3): pp.145-149.
501. *Pernas, L., Scorrano, L.* [2016]. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu. Rev. Physiol.*, 78, 505–531.
502. *Petronilli, V., Penzo, D., Scorrano, L., Bernardi, P., and Di Lisa, F.* [2001]. The mitochondrial permeability transition duration of pore openings in situ. *J. Biol. Chem.* 276, 12030–12034.
- Petrozzi L., Ricci G., Giglioli N.J., Siciliano G., Mancuso M.* [2007]. Mitochondria and Neurodegeneration. *Biosci Rep.* 27:87-104.
503. *Pierson D J.* [2000]. Pathophysiology and Clinical Effects of Chronic Hypoxia. *Respir Care.* 45(1): pp. 39-51.
504. *Piquereau J, Caffin F, Novotova M, Lemaire C, Veksler V, Garnier A, Ventura-Clapier R and Joubert F* [2013]. Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? *Front. Physiol.* 4:102. doi: 10.3389/fphys.2013.00102
505. *Pitkänen S., B.H. Robinson.* [1996a]. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J. Clin. Invest;* 98: pp. 345-351.
506. *Pitkänen S., Merante F, McLeod D.R., B.H. Robinson.* [1996b]. Familial cardiomyopathy with cataracts and lactic acidosis: A defect in complexes I of the mitochondrial respiratory chain. *Pediatr. Res;* 39: pp. 513-521
507. *Porwol T, Eheleben W, Brand V, Acker H.* [2001]. Tissue oxygen sensor function of NADPH oxidase isoforms, an unusual cytochrome aa₃ and reactive oxygen species. *Respiration Physiology;* 128 (3): pp. 331-348.
508. *Poston, C.N., Krishnan, S.C., and Bazemore-Walker, C.R.* [2013]. In depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM), *J. Proteomics,* 79, 219–230.

509. *Prabhakar NR.* [2000]. Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors *J Appl Physiol* 88:2287-95
510. *Psarra AM, Sekeris CE.* [2008]. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life.* 60(4):210-223;
511. *Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE.* [2006]. The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *ol Cell Endocrinol.* 246(1-2):21-33.
512. *Purshottam T, Chosh N.C.* [1972]. Effect of acetazolamide (diamox) at different dose levels on survival time of rats under acute hypoxia and on Na⁺,K⁺-ATPase activity of rat tissue microsomes.//*Aerospace Med.* v.43, N6, p.610.
513. *Ramasarma T.* [1985]. Natural occurrence and distribution of coenzyme Q. In: *Lenaz G (ed) Coenzyme Q. Biochemistry, Biogenetics and Clinical Applications of Ubiquinone.* John Wiley and Sons, New York, NY, pp 67–81
514. *Ramirez-Aguilar S. J., M. Keuthe, M.* [2011]. The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability. *J. Biol. Chem.* V. 286. P. 43045–43053.
515. *Raturi, A., and Simmen, T.* [2013]. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM), *Biochim. Biophys. Acta*, 1833, 213–214.
516. *Reipert S., Steinbock F., Fischer I., Bittner R.E., Zeold, A., Wiche G.* [1999]. Association of mitochondria with plectin and desmin intermediate filaments in striated muscle. *Exp. Cell Res.* 252. 479–491.
517. *Reynafarie B.* [1962]. Myoglobin content and enzymatic activity of muscle and altitude adaptation. *J.Appl.Physiol.* V.17. P.301-309.
518. *Rieusset J.* [2011]. Mitochondria and endoplasmic reticulum: Mitochondria–endoplasmic reticulum interplay in type 2 diabetes pathophysiology. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology.* V. 43. No 9. P. 1257–1262.
519. *Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiari P., Bononi A., De Stefani D., Giorgi C., Leo S., Rimessi A., Siviero R., Zecchini E., Pinton P.* [2009]. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta.* V. 1787. N. 11. P. 1342-1351
520. *Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T.* [1998]. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science.* 280. 1763–1766.
521. *Roberts E., Frankel S.* [1950]. γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem.* V. 187, N 1. P. 55–63.
522. *Roberts E., Rothstein M., Baxter C.F.* [1958]. Some metabolic studies of gamma-aminobutyric acid // *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* V. 97, N 4. P. 796-802.
523. *Robinson B.H.* [1998]. Human Complex I deficiency: Clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Bioch. Biophys. Acta*, 1364, pp.271-286.
524. *Rouslin W., Millard R.W.* [1980]. Canine Myocardial Ischemia: Defect in Mitochondrial Electron Transfer Complex I // *J. Mol. Cell. Cardiol.* V. 12, pp. 639-645.
525. *Rowland, A. A. and Voeltz, G. K.* [2012]. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 607-625.
526. *Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, Schwarzler C, Junt T, Voshol H, Meingassner JG, Mao X, Werner G, Rot*

A, Carballido JM [2008]. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol* 9(11):1261–1269.

527. Sadagopan N, Li W, Roberds SL, Major T, Preston GM, Yu Y, Tones MA. [2007]. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am J Hypertens* . 20(11):1209–1215.

528. Sadek HA, Sweda PA, Sweda LI. [2004]. Modulation of mitochondrial complex I activity by reversible Ca^{2+} and NADH mediated superoxide anion dependent inhibition. *Biochemistry*; 43(26): pp. 8494–502.

529. Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T. [2006]. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the frank-starling law. *J. Physiol. (London)*.; 571:253–273.

530. Saks VA, Kaambre T, Sikk P, Eimre M, Orlova E, Paju K, Piirsoo A, Appaix F, Kay L, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Seppet E. [2001]. Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem. J.*;356:643–657.

531. Saks V, Kuznetsov A, Andrienko T, Usson Y, Appaix F, Guerrero K, Kaambre T, Sikk P, Lemba M, Vendelin M. [2003]. Heterogeneity of ADP diffusion and regulation of respiration in cardiac cells. *Biophys. J.*;84:3436–3456.

532. Sanborn T, Gavin W, Berkowitz S., Perille T, Lesch M. [1979]. Augmented conversion of aspartate and glutamate to succinate during anoxia in rabbit heart *Am J Physiol*; 237: pp. 535–541.

533. Santel A., Fuller M. T. [2001]. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. // *J. Cell Sci.*. V. 114. No 5. P. 867–874.

534. Sapieha P. [2012]. Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood*. 2012. V 120, N 11. P. 2182–2194.

535. Sapieha P., Sirinyan M., Hamel D., Zaniolo K., Joyal J.-S., Cho J.-H., Honoré J.-C., Kermorvant-Duchemin E., Varma D.R., Tremblay S. et al. [2008]. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature Medicine*. V. 14, N 10. P. 1067–1076.

536. Sato A., Nakada K., Hayashi J. [2006]. Mitochondrial dynamics and aging: mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. // *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1763. No. 5–6. P. 473–481.

537. Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., and Vonck, J. [2006]. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281, 15370–15375.

538. Schägger, H., and Pfeiffer, K. [2000]. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO. J* 19. 1777–1783

539. Schieber M, Chandel N.S. [2014]. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Bio*. 1 24(10):453–462.

540. Schmid S.L., Frolov V.A. [2011]. Dynamin functional design of a membrane fission catalyst. // *Annu Rev Cell Dev Biol*.. V. 27. No 10. P. 79–105.

541. Schroedel C., McClintock D.S., Budinger S, Chandel N.S. [2002]. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am.J. Physiol.Lung Cell Mol Physiol*; 283: pp.922–931.

542. Seiler N., Wagner G. [1976]. NAD⁺-dependent formation of γ -aminobutyrate (GABA) from glutamate // *Neurochemical Research*. V. 1, N 1. – P. 113–131.

543. Sekine T., Watanabe N., Hosoyamada M., Kanai Y, Endou H. [1997]. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem*. V. 272, N 30. P. 18526–18529.

544. Selak M A, Armour S M, McKenzie E.D. [2005]. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*;7: pp. 77-85.
545. Semenza G.L. [2000]. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Genes & Development*. 14: pp.1983-1991.
546. Semenza G.L. [2002]. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Bioch. Pharmacol*. 64: pp. 993-998.
547. Semenza G.L. [2004]. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level // *Physiology*. N 19. P. 176-182.
548. Semenza G.L. [2009]. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 // *Physiology*. V. 24, N 97. P. 96-106.
549. Semenza G.L. [2011]. Oxygen sensing, homeostasis, and disease // *N Engl J Med*. V. 365, N 6. P. 537-47.
550. Semenza G.L. [2012]. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine // *Cell*. V. 148, N 3. – P. 399-408.
551. Semenza G.L., Shimoda L.A., Prabhakar N.R. Regulation of gene expression by HIF-1 // *Novartis Found Symp.* – 2006. – N 272. – P. 2-8.
552. Semenza G.L., Wang G.L. [1992]. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation // *Mol. Cell. Biol*. V. 12, N 12. P. 5447-5454.
553. Seppet EK, Kaambre T, Sikk P, Tiivel T, Vija H, Tonkonogi M, Sahlin K, Kay L, Appaix F, Braun U, Eimre M, Saks VA. [2001]. Functional complexes of mitochondria with Ca, MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in Muscle. *Cells. Bioch. Biophys. Acta.*;1504:379–395.
554. Serviddio, G., Di Venosa, N., Federici, A., D'Agostino, D., Rollo, T., Prigigallo, F., Altomare, E., Fiore, T., and Vendemiale, G. [2005]. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion. *FASEB J*. 19:354–361.
555. Siesjo B.K. [1978]. Brain energy metabolism. Willey and Sons. New York. 607 p.
556. Signes A. and Fernandez-Vizarra E. [2018]. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. *Essays in Biochemistry*.62255–270<https://doi.org/10.1042/EBC20170098>
557. Sivaramakrishnan S, Ramasarma T. [1973]. Oxidation of succinate in heart, brain, and kidney mitochondria in hypobaria and hypoxia. *Biochim Biophys Acta.*; 321(2): pp. 423-36.
558. Sivaramakrishnan S, Ramasarma T. [1975]. Oxidation of succinate in heart, brain, and kidney mitochondria in hypobaria and hypoxia. *Environ Physiol Biochem*; 5(3): pp. 189-200.
559. Skulachev V. P. [2001]. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci*. 26, 23-29
560. Skulachev V.P. [2006]. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 11:473–485
561. Smirnova E., Griparic L., Shurland D.L., Blik A.M. [2001]. Dynamin –related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. // *Mol Biol Cell*.. V. 12. No 8. P. 2245-2256.
562. Sobol H., Cohen P.M. [1958]. Protein of heart in experimental cardiac hypertrophy in the rat. *Proc.Soc.Exp.Biol*. New York. V.99. P.656.

563. Song Z., Ghochani M., McCaffery J.M., Frey T.G., Chan, D.C. [2009]. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol. Biol. Cell.* 20. 3525–3532.
564. Soubannier V., McBride H.M. [2009]. Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. // *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1793. No 1. P. 154–170.
565. Strauss M. [2008]. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane / M. Strauss, G. Hofhaus, R. R. Schroder, W. Kuhlbrandt // *EMBO J.* V. 27. – P. 1154–1160.
566. Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., and Stuart, R.A. [2012]. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bcl-cytochrome c oxidase supercomplex. *Mol Cell Biol* 32, 1363–1373
567. Stroka D M, Burkhardt T, Desballerts I. [2001]. HIF-1 is expressed in normoxia and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEJ*; 15: pp. 2445-2453.
568. Suen D. F., Norris K. L., Youle R. J. [2008]. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 22, 1577-1590.
569. Sugioka, R., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. [2004]. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 52726-52734.
570. Sukhorukov V.M., Meyer-Hermann M. [2015]. Structural Heterogeneity of Mitochondria Induced by the Microtubule Cytoskeleton. *Sci. Rep.* 5. 13924.
571. Suki, B., Parameswaran, H., Imsirovic, J., Bartolak-Suki, E. [2016]. Regulatory Roles of Fluctuation-Driven Mechanotransduction in Cell Function. *Physiol*, 31, 346–358.
572. Susheela L, Ramasarma T. [1973]. Modulation of succinate dehydrogenase in response to environmental stress conditions of hypobaria and hypoxia. *Biochim Biophys Acta*; 321(2): pp.423-36.
573. Taegtmeyer H. [1978]. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. *Circ. Res.* V. 43, N 5. P. 808-815.
574. Tait S.W.G., Green D.R. [2012]. Mitochondria and cell signaling. *J Cell Sci.* 125: 807-815.
575. Tamura M., Oshino N., Chance B., Silver I.A. [1978]. Optical measurements of intracellular oxygen concentration of rat heart in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 191. P. 8-22.
576. Tang H.L., Lung H.L., Wu K.C., Le A.H., Tang, H.M., Fung, M.C. [2008]. Vimentin supports mitochondrial morphology and organization. *Biochem. J.* 410. 141–146.
577. Territo P. R., Mootha V. K., French S. A., Balaban R. S. [2000]. Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol.* V. 278. P. C423-435.
578. Tilokani L., Nagashima S., Paupe V., Prudent J. [2018]. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays In Biochemistry.* 2018. 62(3) 341-360
579. Toleikis A.J. [1980]. Cytochrome oxidase activity of mitochondria from ischemic and reperfused myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v.12. Supp. 1. p. 169-173.
580. Toleikis A., Trumbeckaite S., Majiene D. [2005]. Cytochrome C effect on respiration of heart mitochondria: influence of various factors. *Biosci Rep.* V.25. N 5-6. P. 387-397.

581. Tondera D., Czauderna F., Paulick K., Schwarzer R., Kaufmann J., Santel A. [2005]. The mitochondrial protein MTP 18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. // *Journal of Cell Science*. V. 118. No 14. P. 3049-3059.
582. Tondera D., Grandemange S., Jourdain A., Karbowski M., Mattenberger Y., Herzig S. [2009]. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J*. 28, 1589–1600
583. Tondera D., Santel A., Schwarzer R., Dames S., Giese K., Klippel A., Kaufmann J. [2004]. Knockdown of MTF18, a novel phosphatidylinositol 3-kinase dependent protein, affects mitochondrial morphology and induces apoptosis. *J Biol Chem.*. V. 279. No 30. P. 31544 – 31555.
584. Toma I., Kang J.J., Sipos A., Vargas S., Bansal E., Hanner F., Meer E., Peti-Peterdi J. [2008]. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and rennin release in murine and rabbit kidney. *J. Clin. Invest.* V. 118, N 7. P. 2526–2534.
585. Tomitsuka E, Kita K, Esumi H. [2010]. The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments.// *Ann N Y Acad Sci.*;1201: 44-49.
586. Trewin A.J., Berry B.J., Wojtovich A.P. [2018]. Exercise and Mitochondrial Dynamics: Keeping in Shape with ROS and AMPK. *Antioxidants*. 7. 7. P. 1- 21
587. Turrens, J.F. [2003]. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol*, 552, 335-344.
588. Twig G., Hyde B., Shirihai O.S. [2008]. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. // *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1777. No. 9. P. 1092–1097.
589. Van Blik, A.M., Shen Q., Kawajiri S. [2013]. Mechanisms of mitochondrial fission and divergences fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a0110772
590. Varadi, A., Johnson-Cadwell, L. I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V. J., and Rutter, G. A. [2004]. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J. Cell Sci*. 117, 4389–4400.
591. Vargas S.L., Toma I., Kang J.J., Meer E.J., Peti-Peterdi J. [2009]. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release. *J Am Soc Nephrol*. V. 20, N 5. P. 1002–1011.
592. Vartak R, Porras Ch.A-M., Bai Y. [2013]. Respiratory supercomplexes: Structure, function and assembly. *Protein Cell*, 4(8): 582–590.
593. Vernay A., Marchetti A., Sabra A., Jauslin T.N., Rosselin M., Scherer P.E., Demarex N., Orci L., Cosson P. [2017]. MitoNEET-dependent formation of intermitochondrial junctions. *Proc. Natl. cad. Sci. USA*, 114, 8277–8282.
594. Voos W, Rotgers K. [2002]. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *BBA*. 1592: pp.51-62.
595. Wakabayashi T., Green D.E. [1977]. Membrane fusion in mitochondria. I. Ultrastructural basis for fusion. // *J. Electron Microsc.* (Tokyo). V. 26. No 4. P. 305–320.
596. Wang G., Semenza GL. [1993]. Characterization of hypoxia-inducible factor I and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol Chem.*; 268: pp. 21513-21518.
597. Weinberg J.M., Venkatachalm M.A., Nancy F. [2000]. Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury. *Am.J. Renal Physiol*; 279: pp.927-943.

598. *Welchen E., J. Klodmann, H.P. Braun.* [2011]. Biogenesis and supramolecular organization of the oxidative phosphorylation system in plants // In F. Kempk en, ed. *Plant Mitochondria*. New York: Springer,., –P. 327–355.
599. *Wenger R.* [2000]. Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation J. Exp. Biol. N 203.P. 1253–1263.
600. *Wenz, T., Hielscher, R., Hellwig, P., Schägger, H., Richers, S., and Hunte, C.* [2009]. Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc(1) complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim Biophys Acta* 1787, 609–616.
601. *Westerman B.* [2010]. Mitochondrion dynamics in model organisms: wath yests worms and flieshave taught us about fusion and fission of mitochondria. *Semin.Cell Dev. Biol.*, 21, 542-549.
602. *Wood J.D., Watson W.J.* [1963]. Gamma-aminobutyric acid levels in the brain of rats exposed to oxygen of high pressures // *Can. J. Biochem. Physiol.* V. 41, N 9. P. 1907-1913.
603. *Zhao J., Liu T., Jin S., Wang X., Qu M., Uhlen P., Tomilin N., Shupliakov O., Lendahl U., Nister M.* [2011]. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. // *EMBO J.* 2011. V. 30. No 14. P. 2762-2778.
604. *Zhao J., Lendahl U., Nister M.* [2013]. Regulation of mitochondrion dynamics: convergences and divergences between yest and vertebrates. *CELL mol. Life Sci.*, 70.951-976.
605. *Zhang M, Mileykovskaya E., Dowhan W.* [2002]. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane./ *J. Biol. Chem.* –. – V. 277, № 46. – P. 43553–43556
606. *Zhang Z., Tan M., Xie Z., Dai L., Chen Y., Zhhao Y.* [2011]. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat. Chem. Biol.* V. 7, N 1. P. 58–63.
607. *Zhu H., Bunn F.* [1999]. Oxygen sensing and signaling: impact on regulation of physiologically important genes. *Respir Physiol.*; 2: pp. 239-247.
608. *Zickermann V., Dröse S., Tocilescu M.A., Zwicker K.,Kerscher S., Brandt U.* [2008]. Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 475–483.
609. *Züchner, S., I.V. Mersyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E.L. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, et al.* [2004]. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36:449–451.

Монография

Лукьянова Л.Д.

Сигнальные механизмы гипоксии

Подписано в печать 11.12.2019

Формат 60x84 1/8

Бумага офсетная. Гарнитура Times

Уч.-изд. л. 14,71. Усл.-печ. л. 15,44

Тираж 300 экз.

Издатель – Российская академия наук

Публикуется в авторской редакции

Отпечатано в экспериментальной цифровой
типографии РАН

Издается по решению Научно-издательского совета
Российской академии наук (НИСО РАН)
и распространяется бесплатно