

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

На правах рукопису

АНТОНОВА Ірина Іванівна

СТАН ЛІЗОСОМАЛЬНОГО АПАРАТУ КЛІТИН
РІЗНИХ ОРГАНІВ ПРИ ГІПОКСІЇ

03.00.13—фізіологія людини і тварин

Автореферат дисертації
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

591.1



00357768 (-)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі по вивченню гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН України.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор **М. М. Середенко**

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Н. В. Луніна**

доктор біологічних наук, професор **С. Д. Гройсман**

Провідна установа:

Київський університет ім. Тараса Шевченка

Захист дисертації відбудеться «*1*» *червня* 1994 р. о. *14* год. на засіданні спеціалізованої вченої ради при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця АН України (252024, Київ-24, вул. Богомольця, 4).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН України.

Автореферат розіслано «*22*» *квітня* 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук

З. О. Сорєкіна-Маріна

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. На молекулярному рівні найбільш загальною відповідною реакцією організму на дію різних екстремальних факторів вважається зміна структури і проникливості клітинних мембран (Панин, Маянская, 1967). Незважаючи на посилений інтерес дослідників до внутрішньоклітинного механізму адаптаційної відповіді організму на дію надзвичайних подразників, ця проблема ще далека від свого завершального рішення. Зокрема до цього часу не з'ясований молекулярний механізм захисно-приспособних реакцій, обумовлених зміною функціонального стану біомембран і участю ферментних систем клітин у процесі адаптації.

Вивчення активності лізосомальних ферментів та стану лізосомальних мембран являє собою загальнобіологічний інтерес, тому що лізосоми, маючи високу реактивність, одними з перших серед клітинних органелл приймають активну участь у розвитку адаптаційних реакцій. На помірні впливи лізосомальний апарат клітин відповідає реакцією активації, яка не супроводжується його пошкодженням і спрямована на оптимальну адаптацію внутрішньоклітинного метаболізму та структур до нових умов існування. Проте надмірний за силою і тривалістю стресорний вплив, неадекватний адаптивним можливостям організму, може привести до розриву лізосомальних мембран та виходу кислих гідролаз у цитоплазму клітини, внаслідок чого може розвинути ланцюговий цитолітичний процес (Панин, Маянская, 1964). До цього часу лишається нез'ясованими, які механізми лежать в основі порушення реакцій адаптації і зтягнення лізосомального апарату у процесі ініціації і розвитку тканинного пошкодження.

Великий інтерес являє дослідження активності лізосомальних ферментів при гіпоксії, оскільки стан кисневої недостатності розвивається в організмі при дії багатьох факторів зовнішнього

середовища, до того ж практично кожне захворювання так чи інакше супроводжується кисневою недостатністю. Назвні у літературі дані про зміну активності лізосомальних ферментів у різних органах і тканинах в умовах гіпоксії порівняно недостатні і мають протилежний характер. Більша частина досліджень проведена у важкоспівставних умовах /Макарова, 1978; Табукашвили и др., 1991; Loegering et al., 1975; Acosta et al., 1978; Frederiks, Marx, 1983; Wattiaux, Wattiaux-de Coninck, 1984/.

Мета роботи:

Вивчити стан лізосомального апарату клітин різних органів і тканин організму в умовах гострої гіпоксії різного генезу і різного ступеню важкості та з'ясувати деякі механізми активації лізосомального апарату.

Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити наступні задачі:

- вивчити активність ключових лізосомальних ферментів - катепсину D і кислій фосфатази - у різних тканинах організму (легень, серця, печінки, головного мозку) і у плазмі крові при гіпоксичній, циркуляторно-гемічній та гемічній гіпоксії різного ступеню важкості;

- провести електронно-мікроскопічне дослідження структурно-функціональних змін лізосомального апарату легень при тяжких ступенях гіпоксичної і циркуляторно-гемічної гіпоксії;

- вивчити активність ключових лізосомальних ферментів - катепсину D і кислій фосфатази - у легенях, серці, печінці, головному мозку і плазмі крові при тяжких ступенях гіпоксичної циркуляторно-гемічної та гемічної гіпоксії на фоні попереднього введення кверцетину;

- вивчити зміни рівню циклічних нуклеотидів (цАМФ і цГМФ) у

плазмі крові, тканинах легень, печінки, серця, головного мозку в умовах гемічної і циркуляторно-гемічної гіпоксії;

- вивчити вплив адаптації шурів до переривчастої гіпоксичної гіпоксії на стан лізосомального апарату у тканинах життєво важливих органів і на рівень активності кислих гідролаз у плазмі крові.

Наукова новизна.

Встановлено, що збільшення проникливості лізосомальних мембран в умовах кисневої недостатності відбувається при розвитку в організмі вторинної тканинної гіпоксії незалежно від характеру гіпоксичного впливу.

Показано, що у першу чергу на недостачу кисню реагують лізосоми легень і печінки. Рівень ферментів кислих гідролаз відтворює ступінь важкості гіпоксичного впливу. Показано, що при різних типах гіпоксії внесок факторів, дестабілізуючих лізосомальні мембрани, може бути неоднаковим: при гіпоксичній гіпоксії лабілізація лізосомальних мембран в більшій мірі обумовлена активацією процесів перекисного окислення ліпідів, а при гемічній гіпоксії та циркуляторних зрушеннях - зміною концентрації циклічних нуклеотидів.

Одержані в експериментах по адаптації шурів до переривчастої дії гіпоксичної гіпоксії дані про зростання стабільності лізосомальних мембран дозволяють припустити, що одним з механізмів підвищення стійкості організму до дії надзвичайних подразників при адаптації до гіпоксії є збільшення резистентності лізосомального апарату.

Кількісний аналіз результатів уперше дозволив одержати порівняльні дані про особливості активації лізосом у клітинах різних органів при гіпоксії різного типу і різного ступеню важкості.

Теоретичне і практичне значення роботи.

Одержані результати сприяють більш широкому розумінню молекулярних механізмів розвитку гіпоксії різного походження. Одержані дані розширюють уявлення відносно генезу і механізмів компенсації, пов'язаних з функціональним станом мембран лізосом і участю кислих гідролаз у процесах адаптації вторинної тканинної гіпоксії при гіпоксичних станах, викликаних зниженням вмісту або парціального тиску кисню у вдихуваному повітрі і гострій кровотраті.

Практичне значення дослідження визначається можливістю прогнозу адаптації і оцінки стану резистентності організму, а також розробки засобів профілактики і корекції порушень гомеостазу. Одержані результати можуть бути корисними в фармакології для створення ліків, які діють посередньо через лізосоми або безпосередньо в них; для диференційної діагностики захворювань, які супроводжуються розвитком в організмі гіпоксичного стану; для розробки нових протизапальних препаратів, які інгібують активність лізосомальних гідролаз.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи викладені на: XIII з'їзді Укр. фізіол. товариства ім. І.П.Павлова (Харків, 1990); 2-й Всесоюз. конференції "Фармакологическая коррекция гипоксических состояний" (Гродно, 1991); III Міжнародн. симпозіумі "Системно-антисистемная регуляция в живой и неживой природе" (Київ, 1993); конференції "Актуальные проблемы патофизиологии экстренальных состояний", присвяченія 100-річчю з дня народження акад. АМН СРСР І.Р.Петрова (Санкт-Петербург, 1993); засіданні сектору вісцеральних систем Інституту фізіології ім. О.О.Вогомоляца АН України (1993).

Структура та об'єм роботи. Дисертація викладена на 120 стор. машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури, 5 глав, висновків та списку літератури. Список літератури має 212 джерел. Робота ілюстрована 9 малюнками, 15 таблицями.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведені на 292 білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар. Електронномікроскопічні дослідження виконані спільно із старшим науковим співробітником К.В. Розовою. Експерименти виконані відповідно плану науково-дослідної роботи Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця АН України.

Досліди виконані під хлоралозо-уретановим наркозом (5 мг хлоралози та 50 мг уретану на 100 г маси тварин). Наркотичну суміш одноразово вводили внутрішньочеревинно у вигляді підігрітого до 37°C розчину.

Були використані наступні експериментальні моделі:

гіпоксична гіпоксія - щури дихали протягом 30 хвилин газовими сумішами з концентрацією кисню 14 %, 12 %, 7 % в азоті;

циркуляторно-генічну гіпоксію створювали, випускаючи із загальної сонної артерії на протязі 5-10 хвилин 10-15, 15-20 та 25-30 % об'єму циркулюючої крові (ОЦК) /Головни, Подгурская, 1974; Кочетков, 1984; Налорк, 1985; Середенко и др., 1987/;

генічну гіпоксію моделювали, заміщуючи об'єм випущеної крові рівним об'ємом кровозамінника геосену, який не містить формених елементів та гемоглобіну крові.

В усіх експериментальних моделях гіпоксія тривала 30 хв. Тривалість гіпоксичної експозиції в 30 хв була обумовлена тим, що, як показано раніше у нашій лабораторії /Лауер і др., 1972/,

за цей період основні показники кисневого режиму і кисеньтранспортних систем організму після короточасного перехідного періоду, який триває від 5-12 хв при менш різкій (14,4 % кисню) гіпоксичній гіпоксії до 12-20 хв при гіпоксії більш важкого ступеню (7,8 % кисню), вже виходять на порівняно стабільний рівень стану стійкої рівноваги.

Кверцетин вводили щурам внутрішньочеревинно у дозі 1 мг/100 г маси тварин. Контрольні дослідження із використанням кверцетину проводили через 60 хвилин після введення препарату, тому що максимум дії кверцетину спостерігався через 60 хвилин після його введення /Колчин, 1991/. Гостру гіпоксію на фоні введення кверцетину моделювали через 30 хвилин після введення препарату. Гіпоксія також тривала 30 хвилин.

Адаптація щурів до переривчастої гіпоксії проводилась у барокамері в умовах "підйому" на "висоту" 5000 м на протязі 6 тижнів щодобово по 6 годин.

Для оцінки стану лізосом у різних тканинах готували гомогенати печінки, легенів, серцево-м'язовий та головного мозку за стандартною методикою у 0,25 М розчині сахарози, в яких виявляли вільну, неосажену (105000 г, 60 хв) та загальну (у присутності 0,1 % тритону X-100) активність маркерних лізосомальних ферментів: кислій фосфатази і катепсину D. Паралельно активність цих же ферментів виявляли у плазмі крові /Панин, Маянская, 1987; 1992/.

Активність кислій фосфатази виявляли колориметричним модифікованим методом Воданського /Покровский, 1969/ за прирістом фосфату, який утворювався у результаті ферментативного розчинення β -гліцерофосфату натрію фірми "Merck", (Німеччина).

Активність катепсину D вимірювали на спектрофотометрі СФ-4Б

(“Ломо”, СРСР) за методом Barrett і Хіт (1980), у якості субстрату використовували гемоглобін фірми “Keanal” (Угорщина).

Вміст циклічних нуклеотидів у тканинах і у плазмі крові виявляли радіоімунним методом з використанням стандартних наборів фірми “Amersham” (Англія).

Взяття тканин легенів для електронномікроскопічних досліджень здійснювали за загальноприйнятими методами (Уикли, 1975) з фіксацією глутаральдегідом та чотириокисом осмію та наступною заливкою в епон-аралдит. Дослідження ультратонких зрізів проводили на електронному мікроскопі “JEM-100 CX” (Японія).

Статистичну обробку одержаних результатів проводили з використанням критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для з'ясування ролі лізосом в адаптаційних реакціях при розвитку в організмі гіпоксичної гіпоксії нами були проведені дослідження лізосомального апарату в умовах гіпоксичного впливу різної інтенсивності.

При зниженні парціального тиску кисню у вдихуваному повітрі до 14 % (100 мм рт.ст.) активність катепсину D та кислій фосфатази у тканинах легенів, серця, головного мозку і печінки достовірно не змінювалась у порівнянні з контролем.

При вмісті кисню у суміші, що дорівнював 12 % (85 мм рт.ст.) у легенях збільшувалась вільна активність катепсину D і кислій фосфатази приблизно у 3 рази, у печінці зросла вільна активність тільки кислій фосфатази (приблизно у 1,5 рази). У серці та головному мозку активність лізосомальних ферментів не

змінювалась. У крові активність кислої фосфатази була близька до контрольного значення ($0,08 \pm 0,01$ ммоль/год⁻¹ л⁻¹; $P > 0,2$), а активність катепсину D спостерігалася лише у слідових кількостях.

Подальше зниження вмісту кисню у вдихуваній суміші до 7 % (52 мм рт.ст.) спостерігалася активація лізосом у всіх досліджених тканинах експериментальних тварин, супроводжуючись збільшенням усіх видів активності катепсину D. Загальна активність кислої фосфатази знижувалася у всіх тканинах, при цьому відбувалося значне збільшення вільної активності при паралельному зникненні зв'язаної. Зміна активності катепсину D найбільше була виражена у легенях, а кислої фосфатази - у печінці. Про стан лізосомальних мембран у певній мірі можна судити за змінами відношення вільної активності ферментів до загальної. Для катепсину D цей показник майже не відрізнявся від контрольного рівню, тільки в легенях це відношення збільшилося приблизно в 1,8 рази. Відношення вільної активності кислої фосфатази до загальної збільшувалося у всіх тканинах у 3-4 рази. Усі ці зміни супроводжувалися появою у плазмі крові активності катепсину D ($0,28 \pm 0,001$ ΔE₂₈₀/г) та збільшенням активності кислої фосфатази ($0,39 \pm 0,02$ ммоль/год⁻¹ л⁻¹; $P < 0,001$).

При кровотраті 10-15 % ОЦК достовірних змін активності лізосомальних ферментів у вивчених органах та у крові не знайдено. Збільшення об'єму випущеної крові до 15-20 % ОЦК приводило до зменшення загальної активності кислої фосфатази у печінці та легенях приблизно на 10 %, при цьому вільна активність зросла у печінці приблизно в 1,6 рази, а у легенях - у 2,9 рази. Вільна активність катепсину D достовірно змінювалась тільки у легенях, де вона зросла на 50 %, одночасно збільшилась загальна (приблизно на 30 %) і зв'язана активність (на 28 %). У

печінці змінилося співвідношення вільної та зв'язаної активності катепсину D: вільна збільшилася приблизно на 32 %, а зв'язана зменшилася на 25 %. У серці і головному мозку достовірних змін активності кислих гідролаз не виявлялося. У крові збільшилася активність кислої фосфатази ($0,45 \pm 0,03$ ммоль/год $^{-1}$ л $^{-1}$; $P < 0,001$).

При крововтраті в об'ємі 25-30 % ОЦК спостерігалися зміни активності катепсину D та кислої фосфатази в усіх досліджуваних тканинах: збільшувалася вільна активність (катепсину D - у 1,5 - 2 рази, кислої фосфатази у 2,5 - 3,5 рази) і зменшувалася зв'язана активність. При цьому загальна активність ферментів або зменшувалась, або була близька до контрольних значень. Відношення зв'язаної активності до загальної різко зростало (у 2 - 4 рази порівняно з контролем). У плазмі крові відбувалося подальше збільшення активності кислої фосфатази ($0,94 \pm 0,04$ ммоль/год $^{-1}$ л $^{-1}$; $P < 0,001$) і виявлялася активність катепсину D ($0,89 \pm 0,001 \Delta E_{280/r}$). Слід відмітити, що крововтрата є змішаною формою гіпоксії, тому що у результаті зменшення ОЦК ми маємо характерні ознаки як гемічної гіпоксії - зменшення вмісту гемоглобіну та кіснєвої ємкості крові, так і циркуляторної - зниження хвилиного об'єму крові та швидкості масопереносу кисню /Середенко и др., 1987/. У тих випадках, коли ОЦК після крововтрати відновлюється якимось кровозамінником, що не містить еритроцитів та гемоглобіну, усувається циркуляторний компонент, проте у результаті розведення частини крові, яка лишилася у судинному руслі, знижуються концентрація гемоглобіну, кіснєва ємкість крові і виникає посттрансфузійна гемічна гіпоксія /Климанський, 1983; Ploucha, 1981/. В умовах гемічної гіпоксії активація кислих гідролаз відбувається при крововтраті у об'ємі 15 - 20 % ОЦК із заміщенням. При цьому спостерігалось

збільшення загальної активності катепсину D приблизно в 1,3 рази у всіх досліджуваних тканинах, окрім серцевого м'язу, при паралельному збільшенні вільної і зв'язаної його фракцій. Загальна активність кислій фосфатази у всіх тканинах була близька до контрольного рівню, але у легенях та печінці збільшилася вільна активність цього ферменту (у легенях приблизно у 2,4 рази, а у печінці - в 1,4 рази).

При кровостраті 25-30 % ОЦК із заміщенням спостерігалось збільшення загальної і зв'язаної активності катепсину D у легенях і серці (приблизно в 1,5 рази). Вільна активність катепсину D зросла у легенях у 1,5 рази, а у головному мозку приблизно в 4,9 рази, у серцевому м'язі цей показник достовірно не відрізнявся від контрольного рівня, але мала місце тенденція до його зниження, а у печінці вільна активність катепсину D зменшилася в 1,8 рази. Загальна активність кислій фосфатази достовірно не відрізнялась від контролю, тільки у легенях цей показник незначно зменшувався (в 1,2 рази). Але спостерігався перерозподіл вільної і зв'язаної активності кислій фосфатази у всіх досліджуваних тканинах. Вільна активність збільшилася в 2-2,5 рази, а зв'язана, навпаки, зменшилася приблизно в 1,5 рази.

При гемічній гіпоксії активність кислій фосфатази у плазмі крові була збільшена порівняно з контролем і складала $0,2 \pm 0,03$ ммоль/год⁻¹ л⁻¹ (P(0,001), при середньому ступеню важкості гіпоксичного впливу і $0,52 \pm 0,05$ ммоль/год⁻¹ л⁻¹ (P(0,001) при важкому ступеню гіпоксії. Активність катепсину D спостерігалася у слідових кількостях.

При електронномікроскопічних дослідженнях тканини легень в умовах гіпоксичної та гемічній гіпоксії відмічалось збільшення загального числа лізосом, як первинних, так і вторинних, особливо аутофагічного типу. При циркуляторних порушеннях, навпаки,

характерним було зменшення числа лізосом. Поряд з цим відмічалось значне збільшення кількості мітохондрій, які знаходились у різних функціональних станах, як нових, так і з явними ознаками дегенерації. При усіх вивчаємих типах гіпоксії лізосоми, які можна було спостерігати у електронному мікроскопі, були розміщені у безпосередній близькості від мітохондрій, зовнішня мембрана котрих найчастіше не мала чітких окреслень. Як вважає ряд авторів /Фролов, 1973; Weissmann, 1965; Vasder, Kako, 1980/, лізосоми служать пусковим механізмом, який дає поштовх посиленому поділенню і синтезу мітохондрій, збільшуючи тим самим енергопродукцію клітини, і дозволяє їй справлятися з підвищеним функціональним навантаженням.

Із одержаних результатів видно, що гіпоксія легкого ступеню важкості не чинила впливу на активність лізосомальних ферментів. Гіпоксія середнього ступеню важкості викликала активацію лізосомального апарату клітин. Ця реакція у різних тканинах проявлялася по-різному, що може бути пов'язано з особливостями їх функціональної спеціалізації. Ступінь активації лізосом в усіх вивчаємих тканинах залежала від інтенсивності гіпоксичного впливу, при цьому активність ферментів підвищувалась поступово, паралельно зі збільшенням важкості гіпоксичного впливу на організм. Спостерігалась вибіркковість у зміні активності кислій фосфатази і катепсину D. Неосаджувана активність вивчаємих ферментів у наших дослідженнях не перевищувала контрольних значень і становила 6-7 % від загальної активності. Усі ці факти свідчать про те, що збільшення проникливості лізосомальних мембран відбувалося без порушення їх цілісності і мали оборотний характер /Ланин, Маянская, 1987/.

Аналіз даних літератури дає можливість припустити, що при

гіпоксії у ролі факторів, які спричиняють активацію лізосом, можуть виступати: накопичення лактату, зміщення рН у кислий бік, активація процесів вільнорадикального окислення, зміна концентрації циклічних нуклеотидів /Leighty et al., 1967; Wattiaux, Wattiaux-de Coninck, 1984/.

Дослідженнями, проведеними у нашому відділі на тих же моделях гіпоксичних станів і цьому ж виді тварин, з'ясовано, що при зниженні концентрації кисню у вдихуваній суміші до 12 % і при крововтраті в об'ємі 15-20 % ОЦК і більше, в організмі розвивається вторинна тканинна гіпоксія, яка супроводжується накопиченням молочної кислоти і розвитком декомпенсованого лактат-ацидозу, що веде до активації вільнорадикального окислення і накопичення продуктів перекисного окислення ліпідів в усіх досліджуваних органах і у крові /Minyailenko et al., 1991, Маньковська та ін., 1993/.

Беспосереднім фактором, який викликає дестабілізацію лізосомальних мембран, є вільний гідроксил-радикал /Fong et al., 1973/, вірогідність утворення якого значно збільшується в умовах вторинної тканинної гіпоксії. Слід відмітити, що в організмі не існує ні фізіологічного захисту, ні ферментативної системи для нейтралізації надлишкової кількості гідроксильних радикалів /Gurtner et al., 1987/. У зв'язку з цим, у наступній серії експериментів перед гіпоксичним впливом щурам попередньо вводили кверцетин - представник групи біофлавоноїдів, який має виражені антиоксидантні властивості і є спроможним вилучувати "агресивні" супероксиданіони /Яковлев, Денисов, 1987; Robak, Gryglewski, 1988/. З'ясувалося, що в умовах важкої гіпоксичної гіпоксії (7 % кисню) кверцетин дійсно перешкоджував змінам проникливості лізосомальних мембран і сприяв збереженню функціональної

активності лізосом у вивчасних тканинах. Останнє виражалося, понад усе, у зниженні рівню активності кислих гідролаз у плазмі крові у порівнянні з "чистою" гіпоксією. Загальна активність катепсину D також збільшувалась у всіх вивчасних тканинах, як при "чистій" гіпоксії, але це збільшення тривало загалом за рахунок зв'язаної активності, яка лишається функціонально латентною. Загальна активність кислої фосфатази у тварин, яким вводили кверцетин, зростала по відношенню до контролю в легенях, серці і печінці, тоді, як при "чистій" гіпоксії, спостерігалось зниження цього показника. Однак при кровосетраті (з заміщенням та без заміщення) попередньо введення кверцетин практично не впливав на проникливість лізосомальних мембран і активність кислих гідролаз. Таким чином, незважаючи на його виражені властивості попереджувати активацію процесів перекисного окислення ліпідів та накопичення новостворених їх продуктів /Луцькчук, Савченко, 1983/, цього виявилось недостатньо для підтримання стабільності лізосомальних мембран при циркуляторних порушеннях та гемічній гіпоксії.

Відомо також, що лізосомальні мембрани знаходяться під контролем протеїніназ, які залягають від наявності циклічних нуклеотидів /Федоров, 1978/. Активація протеїніназ циклічними нуклеотидами є одним з головних механізмів їх регуляторної дії, результатом якої є зміна проникливості клітинних мембран, і зокрема, лізосомальних мембран. Слід відмітити, що цАМФ і цГМФ чинять протилежну дію на мембрани лізосом /Федоров, 1979; Иванов и др., 1990; Goldfarb, Glenn, 1983/: високий рівень цГМФ сприяє лабілізації лізосомальних мембран і збільшує вихід кислих гідролаз у цитоплазму клітини. Навпаки, цАМФ виявляє виражену стабілізуючу дію на мембрани лізосом. Крім того, характер

співвідношення циклічних нуклеотидів при різних екстремальних впливах /Kaliner, Auster, 1973/ визначає інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів. При вивченні концентрації цАМФ і цГМФ у легенях, серці, головному мозку, печінці та крові піддослідних тварин нами було виявлено, що при важкій гіпоксичній гіпоксії (7 % кисню) рівень циклічних нуклеотидів в усіх досліджуваних тканинах і в крові достовірно не відрізнявся від контролю. При крововтраті 25-30 % ОЦК, однак, спостерігалось чітке зниження концентрації цАМФ в усіх вивчаємих тканинах і в крові. У печінці та головному мозку паралельно зростала концентрація цГМФ (на 55 і 90 % відповідно). При усуненні циркуляторних зрушень зниження концентрації цАМФ відмічалось у серці і печінці (приблизно на 30-40 %), а різке зростання концентрації цГМФ - у легенях і печінці (приблизно на 60 і 110 % відповідно).

Отримані результати у певній мірі дають пояснення, чому хверцетин практично не виявляв впливу на ступінь лабілізації лізосомальних мембран при крововтраті. Очевидно, при гемічній та циркуляторно-гемічній гіпоксії проникливість лізосомальних мембран у більшому ступені контролюється циклічними нуклеотидами, ніж перекисними радикалами. До того ж, співвідношення циклічних нуклеотидів у клітині, змінюючись при різних екстремальних впливах, визначає і інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів /Kaliner, Austen, 1973/. Таким чином, при гіпоксії проникливість лізосомальних мембран залежить від сполучення різних факторів, однак їх особистий внесок змінюється відносно типу гіпоксичного впливу.

Отже, активація лізосом є одним з ранніх проявів реакції організму на гіпоксію. Можна вважати, що активація лізосомального

апарату у наших дослідженнях. Була біологічно цілеспрямованою і направленою на адаптивну перебудову метаболізму і ультраструктури клітини. Однак, надзвичайний за тривалістю і силою гіпоксичний вплив може викликати значні пошкодження і навіть розрив лізосомальних мембран, у результаті чого кислі гідролази лавиноподібно звільнюються у цитоплазму і вже самі можуть виступати як пошкоджуючий фактор тканин і органів. У зв'язку з цим дуже важливо рішення проблеми: як підвищити резистентність клітин, органів і систем до змін, які відбуваються у навколишньому середовищі. Добре відомо, що при адаптації до гіпоксії відбувається підвищення стійкості організму до дії різноманітних екстремальних факторів [Меерсон, 1986; Стрелков и др., 1988; Радикін и др., 1989].

Щоб з'ясувати деякі механізми і роль лізосом та лізосомальних ферментів у адаптаційній перебудові клітин при гострій гіпоксії і тренування до неї, нами була використана експериментальна модель тривалої переривчастої дії гіпоксії. Тривале (40-45 днів) тренування до гіпоксії в умовах бароканери приводило до збільшення загальної активності катепсину D та кислої фосфатази (у легенях, головному мозку та печінці - на 20-30 %, а у серці - на 50 % від контрольного рівню) за рахунок зростання зв'язаної активності, яка лишається функціонально латентною. Вільна активність ферментів після тренування достовірно не відрізнялася від контрольного значення або навіть дещо зменшувалася.

При співставленні впливу гострої гіпоксії (7 % кисню) на лізосомальні ферменти у тренуваних і нетренуваних до гіпоксії тварин, виявилось, що загальна активність кислої фосфатази у тренуваних до гіпоксії тварин знижувалась у меншому ступені, ніж

у нетренованих. Так, у легенях це зниження у нетренованих тварин становило 32 %, а у тренованих - 20 %, у серцевому м'язі - 14% і 7 % відповідно, у головному мозку - 7 % і 0% відповідно, у печінці - 53 % і 21 % відповідно. Далі можна відмітити, що менше зниження загальної активності кислої фосфатази у тренованих тварин обумовлено тим, що при дуже великому зниженні зв'язаної активності вільна активність значно зростала. Зміни активності катепсину D носили інший характер. У нетренованих тварин загальна активність була різко підвищена у всіх досліджуваних тканинах. В легенях це підвищення становило 70 %, в інших тканинах - приблизно 25 %. Це підвищення відбувалося за рахунок зростання як вільної, так і зв'язаної активності. У тренованих тварин при впливі гострої гіпоксії загальна активність катепсину D підвищувалась у меншому ступені: в легенях - на 18 %, в серці і печінці - на 10 %, в головному мозку - на 8 %. Вільна активність достовірно не відрізнялась від контрольного значення. Підвищення загальної активності відбувалося за рахунок зростання зв'язаної активності. В крові активність кислої фосфатази тренованих щурів була вище контрольного значення приблизно у 2 рази, а нетренованих - 4 рази, активність катепсину D у тренованих щурів виявлялася у слідових кількостях.

Одержані результати свідчать про виражений вплив тривалої гіпоксії на активність лізосомальних ферментів. Періодично активований гіпоксією лізосомальний апарат стає більш резистентним, тобто набуває здібності більш міцно утримувати кислі гідролази у латентному стані.

Таким чином, лізосоми, які є структурною і функціональною одиницею клітини, приймають активну участь у адаптаційних реакціях організму у відповідь на недостачу кисню.

ВИСНОВКИ

1. З'ясовано, що зміна проникливості лізосомальних мембран - активація лізосомальних ферментів - катепсину D і кислій фосфатази в клітинах легенів, серця, печінки і головного мозку при гіпоксичному впливі відбувається при розвитку в організмі вторинної тканинної гіпоксії незалежно від її генезу.

2. Ступінь активації кислій фосфатази і катепсину D залежить від важкості гіпоксичного впливу: більш виражені зміни спостерігаються при важкому ступені гіпоксії (7 % кисню і кровотраті в об'ємі 25 - 30 % ОЦК), ніж при гіпоксичній гіпоксії середнього ступеню важкості (12 % кисню і кровотраті 15-20 % ОЦК).

3. Зміна активності кислій фосфатази і катепсину D у різних тканинах при усіх типах гіпоксії відбувається неоднаково. Більш виражені зміни ферментативної активності спостерігаються у легенях і печінці, ніж в головному мозку і серці.

4. Підвищення активності кислій фосфатази і катепсину D в плазмі крові корелює з важкістю гіпоксичного впливу на організм.

5. Показано, що гіпоксична і генічна гіпоксія приводять до збільшення загальної кількості лізосом і активації процесів аутофагоцитозу у клітинах легенів, тоді як при циркуляторних порушеннях відбувається зменшення числа лізосом як первинних, так і вторинних. Для усіх типів гіпоксії характерні часті випадки тісного контакту лізосом з мітохондріями.

6. При гіпоксії підвищення проникливості лізосомальних мембран, яке супроводжується зміною активності кислих гідролаз, обумовлено сукупністю різних факторів, внесок яких може

змінюватися залежно від типу гіпоксії: при гіпоксичній гіпоксії ведучим дестабілізуючим механізмом є активація процесів перекисного окислення ліпідів, а при генічній гіпоксії та при циркуляторних зрушеннях - зміни концентрації циклічних нуклеотидів.

7. При розвитку в організмі гіпоксичного стану одним із механізмів молекулярних змін, які відбуваються на клітинному рівні, є зміни проникливості лізосомальних мембран і активація кислих гідролаз, що сприяє переходу організму на новий рівень гомеостазу.

8. При адаптації тварин до тривалої переривчастої дії гіпоксичної гіпоксії одним із механізмів підвищення стійкості організму до дії екстремальних факторів може бути збільшення стабільності лізосомальних мембран.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Розова Е.В., Антонова И.И. Некоторые клеточные компенсаторно-приспособительные реакции аэрогенатического барьера легких при гемической и гипоксической гипоксии // Компенсаторно-приспособительные реакции организма при гипоксии. Сб. науч. трудов, Куйбышев: Б.И., 1989. - С. 55-57.

2. Розова К.В., Антонова І.І., Середенко М.М. Фізіологічна характеристика змін вмісту циклічних нуклеотидів за умов зменшення кисневої ємності крові // Розвиток фізіології в Укр. РСР за 1986-1990 рр.: Збірник матер. XIII з'їзду Укр. фізіол. т-ва ім. І.П.Павлова, Харків, 17-21 вересня 1990 р., Київ: Наук. думка, 1990, т. 2., С. 95-96.

3. Середенко М.М., Антонова И.И., Коваль С.Б., Гачковский П.В. Активность кислой фосфатазы в сыворотке крови у крыс при гипоксии различного происхождения // Физиол. журн. - 1991. - т. 37, N 3. - С. 115-118.

4. Середенко М.М., Антонова І.І., Коваль С.Б. Стан лізосомального апарату деяких тканин організму в умовах гіпоксії, викликаній кровотратом // Фізіол. журн. - 1992. - т. 38, N 6. - С. 20-25.

5. Антонова И.И. Стабилизирующее и антистабилизирующее действие циклических нуклеотидов на функциональное состояние лизосомальных мембран при гипоксии // Системно-антисистемная регуляция в норме и патологии. Науч. труды (доклады и материалы) третьего междунар. симпоз., Киев, 10-13 ноября 1993. - Киев: Б.И. 1993. - С. 80-81.

6. Середенко М.М., Антонова И.И., Розова Е.В. Общность и специфичность реакция лизосомального аппарата организма при острой гипоксии различного генеза // Актуальн. проблемы

патофизиологичні екстремальні стани. Тез. докл. конф., посвя-
100-літтю со дня рожд. акад. АМН СРСР І.Р. Петрова, Санкт-Петер-
бург, 23-24 дек. 1993 г. - Санкт-Петербург, 1993. - С. 63.

7. Антонова І.І., Розова К.В., Середенко М.М. Лізосомальний
апарат тканин при різних функціональних станах організму
// І з'їзд Укр. Фізіол. товариства, тези доп., Київ, вересень
1994. - Київ, 1994 (у друці).

Підписано к печати 29.03.94. Объем 1 п.л.
Формат 60x84^{1/16}. Заказ 1023 Тираж 80
Типография ВА ПВО СВ.

AB 29.772