

**І. І. Антонова, М. М. Середенко, О. О. Гончар,
С. Б. Коваль, О. Д. Боярчук**

Вплив гіпоксії різного генезу та ступеня важкості на функціональну активність лізосомального апарату

В опытах на крысах-самцах в условиях острой гипоксии (гипоксической и гемической) изучали активность лизосомальных ферментов (кислой фосфатазы и катепсина Д) и состояние лизосомальных мембран в тканях печени, сердца, легких и головного мозга. Установлено, что изменение проницаемости лизосомальных мембран в клетках изучаемых тканей происходит при развитии в организме вторичной тканевой гипоксии независимо от ее генеза. Степень активации лизосомальных ферментов зависит от тяжести гипоксического воздействия и проявляется в разных тканях неодинаково.

Вступ

Адаптація організму до змін умов існування пов'язана з різноманітними реакціями з боку систем регуляції та метаболізму [8, 10]. Незважаючи на численні дослідження щодо регуляторних та ефекторних механізмів адаптаційної відповіді на дію екстремальних факторів середовища, ця проблема ще далека від свого завершення. До цього часу не з'ясований молекулярний механізм захисно-приспосувальних реакцій, зумовлених зміною функціонального стану біомембран і участю ферментних систем клітин у процесі адаптації. Особливої уваги, на наш погляд, заслуговує участь лізосомального апарату в адаптаційних змінах метаболізму та структур клітин при такому широко розповсюдженому стресовому впливі на організм, як гіпоксія. Вивчення активності лізосомальних ферментів і стану лізосомальних мембран при кисневій недостатності являє собою загальнобіологічний інтерес, тому що лізосоми, маючи високу реактивність, одними з перших серед клітинних органел беруть активну участь у розвитку адаптаційних реакцій [7, 9, 11], до того ж наявні у літературі дані щодо цієї проблеми недостатні та суперечливі [5, 14, 19].

Метою наших досліджень було вивчення за умов гострої гіпоксії різного генезу та різного ступеня важкості змін стану лізосомальних мембран і лізосомальних ферментів у тканинах організму.

Методика

Експерименти проведені на 180 щурах-самцях лінії Вістар масою 150–200 г. Тварин наркотизували хлоралозо-уретановою сумішшю. Були використані такі експериментальні моделі: гіпоксична гіпоксія — щури дихали газовими сумішами з концентрацією кисню 14, 12 та 7 % в азоті; циркуляторно-гемічна гіпоксія, яку створювали, випускаючи протягом 5–10 хв із

© І. І. Антонова, М. М. Середенко, О. О. Гончар, С. Б. Коваль, О. Д. Боярчук

загальної сонної артерії 10–15, 15–20 та 25–30 % від об'єму циркулюючої крові (ОЦК) [2,4]. У цих експериментальних моделях гіпоксія тривала 30 хв.

Після декапітації у тварин швидко видаляли печінку, головний мозок, легені, серце і промивали охолодженим до 0 °С 0,25 моль/л розчином сахарози (рН 7,4). Гомогенати готували за стандартною методикою, розтираючи тканини у 0,25 моль/л розчині сахарози, виготовленому на 0,01 моль/л тріс-НСL-буфері (рН 7,4), в який додавали 0,001 моль/л ЕДТА та 0,02 моль/л КСL [15] у співвідношенні 1 : 9 (маса—об'єм).

Функціональний стан лізосом у гомогенатах оцінювали за вільною, зв'язаною та загальною (при наявності тритону X-100, кінцева концентрація 0,1 %) активністю маркерних лізосомальних ферментів: кислій фосфатази (КФ) і катепсину Д (КД). Паралельно активність цих же ферментів виявляли у плазмі крові [11]. Активність КФ визначали модифікованим методом Боданського [12] за приростом вмісту фосфату, який утворювався у результаті ферментативного розчинення β -гліцерофосфату натрію фірми «Meisk» (ФРН). Активність КД визначали за методом Баррет і Хіт [1], де як субстрат використовували гемоглобін фірми «Reapai» (Угорщина). Виміри проведені на спектрофотометрі типу СФ-46.

Результати досліджень оброблені статистично з використанням критерію *t* Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Результати досліджень свідчать, що при зниженні концентрації кисню у повітрі, яке вдихається, до 14 % (p_{O_2} 100 мм рт. ст.) активність КД і КФ у тканинах легенів, серця, головного мозку та печінки достовірно не змінювалася порівняно з контролем.

При вмісті кисню 12% (p_{O_2} 85 мм рт. ст.) у легенях збільшувалась вільна активність КД і КФ приблизно у 3 рази, у печінці підвищувалась вільна активність тільки КФ (приблизно у 1,5 раза). У серці та головному мозку активність лізосомальних ферментів не змінювалася (табл. 1). У крові активність КФ була близькою до контрольного значення ($0,08 \text{ ммоль} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{л}^{-1} \pm 0,01 \text{ ммоль} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$), а активність КД не визначалася.

Подальше зниження вмісту кисню у суміші, якою дихали тварини, до 7 % (p_{O_2} 52 мм рт. ст.) викликало активацію лізосом у досліджуваних тканинах, що супроводжувалося збільшенням усіх видів активності КД. При цьому відбувалося значне збільшення вільної активності КФ при паралельному зниженні зв'язаної. Зміна активності КД найбільше була виражена у легенях, а КФ — у печінці (табл. 2).

Відомо, що про стан лізосомальних мембран певною мірою можна судити за змінами відношення вільної активності ферментів до загальної [13]. У наших дослідженнях ці відношення майже не відрізнялися від контрольного рівня, лише у легенях значення цього показника збільшилося приблизно в 1,8 раза. Відношення ж вільної активності КФ до загальної підвищилося у всіх тканинах у 3–4 рази. Ці зміни супроводжувалися появою у плазмі крові активності КД ($0,28 \Delta E 280 \pm 0,001 \Delta E 280$) та збільшенням активності КФ ($0,39 \text{ ммоль} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{л}^{-1} \pm 0,02 \text{ ммоль} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$; $P < 0,001$).

Таблиця 1. Вплив гіпоксичної гіпоксії (12 % кисню) на активність лізосомальних ферментів у тканинах щурів контрольної (I) та дослідної (II) груп (M±m)

Об'єкт досліджень	Група тварин	Активність кислої фосфатази, мкмоль/г·хв			Активність катепсину Д, ΔE280		
		загальна	вільна	зв'язана	загальна	вільна	зв'язана
Легені	I	0,075±0,002	0,01±0,001	0,065±0,002	49,5±3,15	4,5±1,08	45,0±2,72
	II	0,071±0,002	0,032±0,004*	0,039±0,003	46,1±2,42	13,8±1,14*	32,3±1,54*
Серце	I	0,043±0,002	0,007±0,001	0,036±0,002	18,0±1,62	6,0±0,75	12,0±1,19
	II	0,041±0,001	0,01±0,001*	0,031±0,004	15,8±0,71	5,4±1,14	10,4±1,25
Мозок	I	0,048±0,002	0,009±0,002	0,039±0,002	16,5±1,62	1,5±0,81	15,0±1,44
	II	0,043±0,001	0,009±0,001	0,027±0,001*	16,5±0,43	3,0±0,86	13,5±0,67
Печінка	I	0,339±0,01	0,043±0,002	0,296±0,008	40,5±3,69	9,0±0,81	31,5±2,93
	II	0,339±0,02	0,079±0,005*	0,260±0,008*	42,6±1,28	8,2±0,99	34,4±2,37

*P<0,05 (тут і в табл. 2, 3, 4).

Таблиця 2. Вплив гіпоксичної гіпоксії (7 % кисню) на активність лізосомальних ферментів у тканинах щурів контрольної (I) та дослідної (II) груп (M±m)

Об'єкт досліджень	Група тварин	Активність кислої фосфатази, мкмоль/г·хв			Активність катепсину Д, ΔE280		
		загальна	вільна	зв'язана	загальна	вільна	зв'язана
Легені	I	0,075±0,002	0,01±0,001	0,065±0,002	49,5±3,15	4,5±1,08	45,0±2,72
	II	0,051±0,004*	0,031±0,003*	0,020±0,003*	84,3±1,23*	13,5±0,56*	70,8±1,08*
Серце	I	0,043±0,002	0,007±0,001	0,036±0,002	18,0±1,62	6,0±0,75	12,0±1,19
	II	0,037±0,001*	0,02±0,001*	0,017±0,001*	22,5±0,45*	6,8±0,56	15,8±0,50*
Мозок	I	0,048±0,002	0,009±0,002	0,039±0,002	16,5±1,62	1,5±0,81	15,0±1,44
	II	0,045±0,002	0,021±0,002*	0,024±0,002*	21,2±0,56*	2,3±0,22	18,9±0,49*
Печінка	I	0,339±0,01	0,043±0,002	0,296±0,008	40,5±3,69	9,0±0,81	31,5±2,93
	II	0,160±0,01*	0,067±0,005*	0,830±0,008*	48,9±1,28*	12,0±1,45*	36,9±1,39*

При 10–15 %-й крововтраті достовірних змін активності лізосомальних ферментів у зазначених органах та у крові не знайдено. Збільшення об'єму до 15–20 % випущеної крові призводило до зменшення загальної активності КФ у печінці та легенях приблизно на 10 %, при цьому вільна активність у печінці підвищилася в 1,6 раза, а в легенях — у 2,9 раза. Вільна активність КД достовірно змінювалася тільки у легенях, де вона підвищилася на 50 %, одночасно збільшилася загальна (приблизно на 30 %) і зв'язана активність (на 25 %). У печінці змінилося співвідношення вільної та зв'язаної активності КД — вільна збільшилася на 32 %, а зв'язана зменшилася на 25 %. У серці та головному мозку достовірних змін активності кислих гідролаз не виявлялося (табл. 3). У крові активність КФ збільшилася ($0,45 \text{ ммоль} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{л}^{-1} \pm 0,03 \text{ ммоль} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$; $P < 0,001$).

При 25–30 %-й крововтраті в об'ємі активність КД і КФ змінювалась у всіх досліджуваних тканинах: збільшувалася вільна активність (КД — у 1,5–2 рази, КФ — у 2,5–3,5 рази) і зменшувалася зв'язана активність. При цьому загальна активність ферментів або зменшувалася, або була близькою до контрольних значень. Відношення зв'язаної активності до загальної різко збільшилося, 2–4 рази порівняно з контролем (табл. 4). У плазмі крові відбувалося подальше збільшення активності КФ ($0,94 \text{ ммоль} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{л}^{-1} \pm \pm 0,04 \text{ ммоль} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$; $P < 0,001$) і виявлялася активність КД ($0,69 \Delta\text{Е } 280 \pm \pm 0,001 \Delta\text{Е } 280$).

Слід зазначити, що гіпоксія легкого ступеня важкості (14 % кисню і 10–15 %-та крововтрата) не впливала на активність лізосомальних ферментів. Значні зміни функціональної активності лізосомального апарату клітин спостерігалися при більш важкому ступені гіпоксії (7 % кисню і крововтрата 25–30 % ОЦК).

Таким чином, ступінь активації лізосом в усіх вивчених тканинах залежала від інтенсивності гіпоксичного впливу, при цьому активність ферментів підвищувалася поступово, паралельно зі збільшенням важкості гіпоксичного впливу на організм. З'язана активність вивчених кислих гідролаз у всіх тканинах не перевищувала контрольних значень, її відхилення становило не більше ніж 6–7 % від загальної активності. Підвищення активності КФ у плазмі крові корелювало зі ступенем важкості гіпоксичного впливу. Усі ці факти свідчать про те, що збільшення проникності лізосомальних мембран відбувалося без порушення їх цілісності [11].

Аналіз даних літератури дає можливість припустити, що при гіпоксії факторами, які спричиняють активацію лізосом, можуть бути накопичення лактату, зміщення рН у кислий бік, активація процесів вільнорадикального окиснення, зміна концентрації циклічних нуклеотидів [19] тощо. Це підтверджують дослідження, проведені у нашому відділі на цих же моделях гіпоксичних станів і на цих же видах тварин. Доведено, що при зниженні концентрації кисню до 12 % у суміші, яку вдихали, і при 15–20 %-й і більшій крововтраті в організмі розвивається вторинна тканинна гіпоксія, котра супроводжується накопиченням молочної кислоти і розвитком декомпенсованого лактат-ацидозу. Це призводить до активації вільнорадикального окиснення і накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів у всіх досліджуваних органах і у крові [6].

Таблиця 3. Вплив гіпоксії, що викликана 15–20 %-ю крововтратою на активність лізосомальних ферментів у тканинах щурів контрольної (I) та дослідної (II) груп (M±m)

Об'єкт досліджень	Група тварин	Активність кислої фосфатази, мкмоль/г·хв			Активність катепсину Д, ΔE280		
		загальна	вільна	зв'язана	загальна	вільна	зв'язана
Легені	I	0,075±0,002	0,01±0,001	0,065±0,002	49,5±3,15	4,5±1,08	45,0±2,72
	II	0,062±0,006*	0,029±0,004*	0,032±0,002*	64,5±2,85*	6,8±0,85	57,8±1,47
Серце	I	0,043±0,002	0,007±0,001	0,036±0,002	18,0±1,62	6,0±0,75	12,0±1,19
	II	0,041±0,002	0,016±0,003*	0,025±0,001*	18,5±1,14	5,6±0,71	12,9±2,4
Мозок	I	0,048±0,002	0,009±0,002	0,039±0,002	16,5±1,62	1,5±0,81	15,0±1,44
	II	0,046±0,003	0,012±0,002	0,034±0,003	17,9±1,42	2,1±0,57	15,8±2,21
Печінка	I	0,339±0,01	0,043±0,002	0,296±0,008	40,5±3,69	9,0±0,81	31,5±2,93
	II	0,309±0,01*	0,070±0,003*	0,239±0,004*	45,5±1,43	6,1±0,72*	39,3±2,33*

Таблиця 4. Вплив гіпоксії, що викликана 25–30 %-ю крововтратою на активність лізосомальних ферментів у тканинах щурів контрольної (I) та дослідної (II) груп (M±m)

Об'єкт досліджень	Група тварин	Активність кислої фосфатази, мкмоль/г·хв			Активність катепсину Д, ΔE280		
		загальна	вільна	зв'язана	загальна	вільна	зв'язана
Легені	I	0,075±0,002	0,01±0,001	0,065±0,002	49,5±3,15	4,5±1,08	45,0±2,72
	II	0,052±0,002*	0,037±0,001*	0,015±0,001*	48,3±0,93	9,9±0,53*	38,4±0,76*
Серце	I	0,043±0,002	0,007±0,001	0,036±0,002	18,0±1,62	6,0±0,75	12,0±1,19
	II	0,033±0,002*	0,023±0,003*	0,01±0,002*	17,1±1,06	9,0±0,79*	8,1±0,91*
Мозок	I	0,048±0,002	0,009±0,002	0,039±0,002	16,5±1,62	1,5±0,81	15,0±1,44
	II	0,039±0,002*	0,021±0,002*	0,018±0,002*	17,1±0,53	3,9±0,53*	13,2±0,53
Печінка	I	0,339±0,01	0,043±0,002	0,296±0,008	40,5±3,69	9,0±0,81	31,5±2,93
	II	0,253±0,01*	0,110±0,003*	0,143±0,005*	32,7±1,72	13,7±2,26*	19,1±1,96*

Під час дослідження було встановлено, що зміна активності КФ і КД у різних тканинах при зазначених типах гіпоксії відбувається неоднаково. Більш виражені зміни ферментативної активності спостерігались у легенях і печінці, ніж в головному мозку і серці, що може бути пов'язано з особливостями їх функціональної спеціалізації [16, 17]. Спостерігалася також вибірковість у зміні активності КФ і КД. Слід зазначити, що виражена гіпоксична та гемічна гіпоксія призводили до значного збільшення загальної активності КД у всіх вивчених органах, і, особливо, у легенях.

Оскільки відомо, що активність катепсинів, як ферментів протеолізу, вища у структурах з інтенсивним білковим обміном [3, 18, 20], імовірно, при гострій гіпоксії деградація білків найбільш інтенсивно відбувається саме у легенях, які, окрім своєї основної (дихальної) функції, відіграють також важливу роль у деяких обмінних процесах.

Таким чином, при розвитку в організмі гіпоксичного стану, незалежно від його генезу, одним із механізмів молекулярних змін, які відбуваються на клітинному рівні, є зміни проникності лізосомальних мембран і активація кислих гідролаз, що, можливо, і впливає на процеси адаптаційної перебудови цитоструктур і метаболізм клітин за умов дії надзвичайного подразника.

I. Antonova, M. Seredenko, O. Gonchar, S. Koval, O. Boyarchuk

**EFFECT OF HYPOXIA OF DIFFERENT ORIGIN
ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF LYSOSOMAL APPARATUS
OF SOME ORGANISM'S TISSUES**

We studied the activity of lysosomal enzymes (acid phosphatase and cathepsine D) and the status of lysosomal membranes of the liver, lung, heart and brain tissues of the male adult rats under acute hypoxia. We found that disturbances of lysosomal membranes permeability in these organs depend on the tissues hypoxia development, not yet on the genesis of hypoxic state. The lysosomal enzymes activation depends on the heaviness of the hypoxic influence.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Science of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баррет Дж., Хит М.Ф. Лизосомальные ферменты. — В кн.: Лизосомы. Методы исследования. — М.: Мир, 1980. — С.25-156.
2. Головин Г.В., Подгурская Р.А. О методах определения величины кровопотери // Вестн. хирургии. — 1974. — **112**, № 6. — С.133-137.
3. Короленко Т.А. Катаболизм белка в лизосомах. — Новосибирск: Наука, Сиб. отд., 1990. — 189 с.
4. Коцетыгов Н.И. Кровозаменители при кровопотере и шоке. — Л.: Медицина, 1984. — 160 с.
5. Макарова В.Г. Возрастные особенности изменений активности лизосомальных ферментов печени при адаптации организма к гипоксии и гипербарической оксигенации // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 1978. — №1. — С.315-324.
6. Маньковська І.М., Середенко М.М., Нагнибеда Н.М. та ін. Особливості механізмів інтенсифікації перекисного окислення ліпідів у тканинах щурів при гіпоксії різного типу // Фізіол. журн. — 1993. — **39**, № 4. — С.25-33.

7. *Маянская Н.Н., Панин Л.И., Николаев Ю.А. и др.* Некоторые механизмы вовлечения лизосом в процесс тканевого повреждения // *Вопр. мед. химии.* — 1990. — **36**, № 6. — С.5-8.
8. *Меерсон Ф.З.* Адаптация, стресс, профилактика. — М.: Медицина, 1981. — 278 с.
9. *Панин Л.Е., Маянская Н.Н., Колосова И.Е. и др.* Роль лизосом в адаптивных реакциях клетки // *Бюл. Сиб. отд. АМН СССР.* — 1982. — **32**, № 2. — С.85-94.
10. *Панин Л.Е.* Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск: Наука, 1983. — 233 с.
11. *Панин Л.Е., Маянская Н.Н.* Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск: Наука, 1987. — 196 с.
12. *Покровский А.А.* Биохимические методы исследования в клинике. — М.: Медицина, 1969. — 652 с.
13. *Покровский А.А., Тутельян В.А.* Лизосомы. — М.: Наука, 1976. — 382 с.
14. *Табукашвили Р.И., Ушаков И.Б., Антипов В.В.* Роль лизосом в механизмах устойчивости к адаптации. — Москва: Наука, 1991. — 213 с.
15. *Bird J.W.C.* Skeletal muscle lysosomes / *Lysosomes in Biology and Pathology.* — Amsterdam: North Holland Publ. Co., 1975. — **4**. — P.77-101.
16. *Kiccinti M.A.* Lysosomes and myocardial cellular injure // *Amer. J. Cardiol.* — 1972. — **30**, № 10. — P.498-502.
17. *Kim S.U.* Brain hypoxia studies in mouse central nervous system culture // *Lab. Invest.* — 1975. — **33**, № 6. — P.658-664.
18. *Pitt D.* Lysosomes and Cell Function. — London: Longman, 1975. — 165 p.
19. *Wattiaux R., Wattiaux D.E., Coninek S.* Effect ischemia on lysosomes // *Internat. Rev. Exper. Pathology.* — 1984. — **26**, № 4. — P. 85-107.
20. *Wildenthal K., Crie J.S.* Lysosomes and cardiac protein catabolism. — In.: *Degradative process in heart and skeletal muscle.* — Amsterdam—New York—Oxford, 1980. — P.113-129.

*Ін-т фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 28.01.99*