

К.В. Розова, А.І. Назаренко, Т.І. Таволжанова, Т.В. Трепацька, М.О.Черкесова

## **Взаємозв'язок тканинного дихання та деяких стереометричних характеристик мітохондрій у тканині легень при різних модифікаціях гіпоксичної гіпоксії**

*В дослідванні на половозрелых белых лабораторных крысах изучена корреляционная зависимость между некоторыми морфо- и стереометрическими характеристиками митохондрий (МХ) в ткани легких и тканевым дыханием при острой гипоксической гипоксии, создаваемой дыханием газовой смесью, содержащей 7% O<sub>2</sub> в азоте в течение 30 мин. В качестве модулирующих фармакологических агентов применяли: индометацин – блокатор циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты (АК); кверцитин и линолеилгидроксамовую кислоту – блокаторы липооксигеназного пути метаболизма АК; таурин – антигипоксант, служащий энергетическим источником при гипоксии, и липин – антигипоксант с выраженным мембранопротекторным эффектом. Показано, что интенсивность дыхания именно гомогенатами ткани легких, а не только митохондриальной фракцией, тесно связана со структурной организацией митохондриального аппарата легких. Причем по уровню потребления кислорода в определенной степени можно судить о структурных изменениях в МХ. Выявлено, что изменение концентрации кислорода в среде приводит к изменению коррелятивных зависимостей между потреблением O<sub>2</sub> и морфо- и стереометрическими характеристиками МХ: в условиях нормоксии тесная связь выявлена между тканевым дыханием, количеством и суммарной поверхностью МХ; при гипоксии такая связь устанавливается между тканевым дыханием, диаметром митохондрий и количеством структурно измененных органелл. Модифицирующие фармакологические агенты играют значительно меньшую роль.*

### **ВСТУП**

В останні роки в біології та медицині досягнуто значних успіхів у дослідженні тонкої структури тканин і клітин, їх молекулярної організації [11, 15]. Але актуальним залишається питання виявлення співвідношення морфологічних (ультраструктурних) змін і даних гістохімічного, біохімічного та навіть фізіологічного аналізу за умов, коли організм піддається будь-яким збуджувальним впливам. До можливих екзогенних факторів збудження належить гіпоксичний вплив на організм. При цьому відомо, що однією з важливих патогенетичних ланок розвитку

гіпоксичного стану є пригнічення фосфорильовальної та дихальної активності мітохондрій (МХ) у клітинах різних тканин і, зокрема, в тканині легень. Гіпоксія сприяє зниженню утворення макроергічних продуктів у системі окисного фосфорильовання; паралельно з загальною зміною дихання спостерігається роз'єднання окисного фосфорильовання. Такі зміни безпосередньо пов'язані з функціональним станом МХ у клітині, а цей стан опосередковується структурною організацією органелл. Причому відомо, що при гіпоксії спостерігаються структурні зміни в МХ, які полягають у дезорганізації мітохондріальної мембрани,

© К.В. Розова, А.І. Назаренко, Т.І. Таволжанова, Т.В. Трепацька М.О.Черкесова

просвітленні або ущільненні матриксу, набуханні та вакуолізації МХ, дезінтеграції крист [3, 8, 15]. Вираженість порушень залежить, з одного боку, від тривалості та сили впливу, з іншого – від можливих факторів, що модифікують перебіг гіпоксії. Оскільки будь-який фізіологічний або патофізіологічний процес, що починається в клітині на молекулярному рівні, не може бути відірваним від матеріальної форми живої речовини, і усі функціональні порушення супроводжуються змінами структури, то для аналізу порушень, які відбуваються у морфофункціональному стані клітин, зокрема при гіпоксії, необхідним є дослідження взаємозв'язків функціонування та морфометричних показників (які характеризують ультраструктуру) клітин і їх окремих органел.

Однією з провідних причин, котрі сприяють порушенню функціональної цілісності клітинних мембран, слід вважати посилення перекисного окиснення ліпідів з утворенням ненасичених жирних кислот, здатних модифікувати проникність мембран при патологічних станах [3]. Пошкодження структури біологічних мембран безпосередньо пов'язані з порушенням аеробної енергосинтезувальної функції клітин, особливо, якщо це стосується мітохондріальних мембран. При цьому відбувається складний ланцюг подій, що включає системні реакції, зумовлені змінами на рівні тканин і клітин [11], які головним чином зводяться до зниження тканинного дихання, підвищення окисно-відновного потенціалу, що безпосередньо пов'язано з деградацією фосфоліпідів через метаболізм арахідонової кислоти (АК) [1,6].

Метаболіти АК, що є високоактивними біорегуляторами, беруть участь у змінах, які відбуваються при розвитку гіпоксичного стану організму. Різноманітність таких змін пов'язана з можливістю перебігу метаболізму АК в організмі по одному з шляхів – ліпооксигеназному або циклооксигеназному.

Суттєвий модулюючий вплив на морфо-

функціональний стан мітохондріального апарату клітин при гіпоксії мають справляти антигіпоксанти різних типів. До таких належать, зокрема препарат ліпін (екзогенні фосфоліпіди у формі ліпосом), що має виражену мембранопротекторну дію [12]; таурин (аміноетансульфо кислота), який може відігравати роль енергетичного джерела при гіпоксії. Остання речовина є найпотужнішою кислотою природного походження, що поліпшує енергетичний метаболізм при гіпоксії, обмежуючи посилене входження іонів кальцію в клітини і стабілізуючи мітохондріальні мембрани [10].

Мета нашої роботи – вивчити взаємозв'язок тканинного дихання та ультраструктури мітохондрій у тканині легень у нормі, при гіпоксичній гіпоксії та модифікації її перебігу за допомогою фармакологічних препаратів.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведені на щурах-самцях масою 270–320 г (12 груп тварин по 5 щурів у кожній групі). До 1-ї групи входили контрольні тварини. Щурів 2-ї групи піддавали дії гіпоксичної гіпоксії (7% O<sub>2</sub> протягом 30 хв). У тварин 3-, 4- та 5-ї груп в умовах нормоксії за допомогою фармакологічних чинників здійснювали вплив на метаболізм АК.

Блокаду циклооксигеназного шляху метаболізму АК проводили за допомогою індометацину (внутрішньовенно 0,5 мг/100 г), який є одним із найпотужніших інгібіторів синтезу простагландинів [6, 14] (3-я група). Як блокатори ліпооксигеназного шляху метаболізму АК застосовували: кверцитин (внутрішньовенно 1 мг/100 г) (4-та група); лінолеїлгідроксамову кислоту (ЛГК) (внутрішньовенно 0,3 мг/100 г), яка є ефективним блокатором 5-, 12- та 15-ліпооксигеназ і здатна блокувати також циклооксигеназу 1 і 2, а також інтерлейкін 1 (група 5) [16, 17]. До 6-ї групи входили щури, яким за умов нормоксії вводили таурин (внутріш-

ньовенно 10 мг/100 г). Тваринам 7-ї групи внутрішньовенно вводили ліпін у дозі 0,5 мг/100 г. Термін дії на організм дослідних тварин усіх використаних препаратів становив 30 хв. Щурам 8–12-ї груп указані фармакологічні чинники у тих самих дозах вводили за 30 хв до 30-хвилинного сеансу дихання гіпоксичною газовою сумішшю: 8-ма група – введення індометацину, 9-та група – кверцитину, 10-та група – лінолеїлгідроксамової кислоти, 11-та група – таурину, 12-та група – ліпіну.

Ультраструктуру мітохондрій у тканині легень досліджували електронно-мікроскопічним методом. Препарати для мікроскопії готували за загальноприйнятою методикою [5]. Шматочки тканини з ідентичних ділянок нижніх часток обох легень піддавали подвійній фіксації глютаральдегідом та оксидом осмію (IV), зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та заливали у суміш епоксидних смол (епон-аралдит). Ультратонкі зрізи товщиною 40–60 нм контрастували уранілацетатом та цитратом свинцю. Препарати досліджували за допомогою електронного мікроскопа JEM-100 CX (Японія).

Споживання кисню подрібненою тканиною легень ( $VO_2$ ) визначали манометричним методом в модифікації Ємельянова [4]. Результати виражали у мкл  $O_2 \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  сухої маси тканини.

Морфометричні та стереологічні дослідження виконували згідно з методикою Вейбеля [2, 13]. При оцінці отриманих результатів застосовано методи варіаційної статистики та кореляційний аналіз [7, 9].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зміни споживання кисню тканиною легень ( $VO_2$ , мкл  $O_2 \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ ) при нормо- та гіпоксії за умов застосування фармакологічних агентів були такими:

1. Нормоксія (контроль)  $3,3 \pm 0,1$
2. Гіпоксія  $3,6 \pm 0,1^*$

3. Нормоксія та індометацин	$2,8 \pm 0,1^{***}$
4. Нормоксія та кверцитин	$2,2 \pm 0,1^{***}$
5. Нормоксія та лінолеїлгідроксамова кислота	$3,2 \pm 0,2$
6. Нормоксія та таурин	$4,4 \pm 0,3^{***}$
7. Нормоксія та ліпін	$3,4 \pm 0,1$
8. Гіпоксія та індометацин	$5,2 \pm 0,2^{***}$
9. Гіпоксія та кверцитин	$5,1 \pm 0,1^{***}$
10. Гіпоксія та лінолеїлгідроксамова кислота	$3,4 \pm 0,1$
11. Гіпоксія та таурин	$3,7 \pm 0,1^*$
12. Гіпоксія та ліпін	$3,1 \pm 0,1^{**}$

\*  $P < 0,05$  порівняно з 1-ю групою;

\*\*  $P < 0,05$  порівняно з 2-ю групою.

Паралельно проводили морфометричну та стереометричну оцінку мітохондріального апарату легень у відповідних умовах експерименту. Визначали загальну кількість МХ – n, кількість структурно змінених органел –  $n_s$ , середній діаметр МХ – d, суму поверхонь МХ в одиниці об'єму досліджуваної тканини –  $Si_{tot}$ . Отримані результати наведені в таблиці.

Слід зазначити, що за умов нормоксії найбільш лабільною морфометричною характеристикою МХ, яка змінюється під впливом фармакологічних речовин, є їх діаметр; при гіпоксії під впливом модифікуючих агентів найбільше змінюється загальна кількість органел і відсоток змінених МХ у мітохондріальному апараті. Найстабільнішим показником як при нормоксії, так і за гіпоксичних умов є сума поверхонь МХ в одиниці об'єму досліджуваної тканини. Останнє ймовірно, можна вважати одним із механізмів збереження ефективної дихальної поверхні в клітині при зміні умов існування тканини.

При аналізі взаємозв'язку споживання кисню легеневою тканиною та морфометричними характеристиками МХ виявлено, що зміна концентрації кисню у вдихуваній газовій суміші суттєво впливає на пріоритетність морфо- та стереометричних ознак органел відносно виконання ними дихальної функції. Причому така закономірність

**Морфометричні та стереометричні характеристики мітохондрій при нормо- та гіпоксії за умов застосування фармакологічних агентів**

Умови експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од/мкм <sup>2</sup>	Кількість структурно-змінених органел, %	Середній діаметр мітохондрій, мкм	Сума поверхонь мітохондрій, мкм <sup>2</sup>
1. Нормоксія (контроль)	9,6±0,2	4,6±0,5	0,39±0,01	5,7±0,5
2. Гіпоксія	15,1±0,6*	18,7±0,7*	0,51±0,02*	8,0±0,2*
3. Нормоксія та індометацин	9,0±0,3**	3,0±0,1***	0,43±0,02**	5,2±0,4
4. Нормоксія та кверцитин	8,5±0,3***	5,3±0,2**	0,49±0,03*	4,8±0,6
5. Нормоксія та лінолеїлгідроксамова кислота	9,4±0,5**	3,9±0,2**	0,50±0,01*	5,9±0,5
6. Нормоксія та таурин	10,2±0,6**	4,0±0,3**	0,36±0,01**	6,3±0,8
7. Нормоксія та ліпін	8,7±0,3***	4,1±0,2**	0,60±0,03***	6,6±0,6
8. Гіпоксія та індометацин	12,3±0,8***	8,5±0,4***	0,68±0,02***	8,4±0,5
9. Гіпоксія та кверцитин	13,0±0,5***	8,0±0,5***	0,70±0,01***	9,0±0,3**
10. Гіпоксія та лінолеїлгідроксамова кислота	10,4±0,2***	14,3±0,2***	0,45±0,04	8,3±0,4
11. Гіпоксія та таурин	14,0±0,4***	18,0±0,6*	0,50±0,03*	7,8±0,7
12. Гіпоксія та ліпін	12,0±0,3***	12,6±0,3***	0,55±0,04*	9,6±0,4**

\* P < 0,05 порівняно з 1-ю групою; \*\* P < 0,05 порівняно з 2-ю групою.

зберігається і при застосуванні фармакологічних препаратів. Так, за умов нормоксії знайдено суттєвий зв'язок між споживанням кисню та загальною кількістю мітохондрій у клітинах тканини легень і сумою поверхонь МХ: середній коефіцієнт кореляції  $VO_2/n$  становив 0,838 ( $q=0,2$ ), а  $VO_2/Si_{tot}$  – 0,816 ( $q=0,2$ ). При цьому кількість структурно змінених МХ та їх діаметр при незмінній концентрації кисню у навколишньому середовищі суттєво не впливали на інтенсивність тканинного дихання ( $r=-0,299$  та  $r=0,370$  відповідно).

Зовсім інша картина була при гіпоксії як у «чистому» вигляді, так і при застосуванні за цих умов фармакологічних засобів. Шкала пріоритетів змінювалася на зворотню: спостерігався тісний зв'язок  $VO_2$  з кількістю структурно змінених МХ та з їх діаметром (середні коефіцієнти кореляції становили -0,729 та 0,891 відповідно;  $q=0,2$  в обох випадках). Натомість загальна кількість МХ та сума їх поверхонь суттєво не впливали на споживання кисню тканиною легень (середні значення  $r$  становили

0,067 та 0,027 відповідно). Можна вважати, що значне збільшення структурно порушених під впливом гіпоксії МХ, по-перше, нівелює роль загального збільшення їх кількості, по-друге, призводить до того, що поверхня мітохондріальних мембран стає нездатною ефективно забезпечувати процес дихання навіть за умов збереження достатньої їх площі.

Таким чином, проведені дослідження дозволяють дійти висновку, що інтенсивність дихання, визначеного саме в гомогенаті тканини легень, а не тільки в мітохондріальній фракції, пов'язана зі структурною організацією мітохондріального апарату легень. Причому за рівнем споживання кисню до певної міри можна судити про структурні зміни в МХ. Окрім того, показано, що зміна концентрації кисню в навколишньому середовищі призводить до зміни кореляційних залежностей між споживанням кисню тканиною легень та морфологічними та стереометричними характеристиками МХ. Модифікуючі фармакологічні агенти відіграють значно меншу роль.

**Rozova K.V., Nazarenko A.I., Tavolzshanova T.I., Trepatskaya T.V., Cherkesova M.A.**

**CORRELATION OF TISSUE RESPIRATION AND SOME MITOCHONDRIA STEREOMETRIC CHARACTERISTICS IN LUNG TISSUE UNDER HYPOXIC HYPOXIA AND ITS PHARMACOLOGICAL MODIFICATIONS**

In experiments on the adult white laboratory rats the correlation of tissue respiration and some morpho- and stereometric characteristics of mitochondria in lung tissue under breathing by air and gas mixture with 7% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> was investigated. The following agents were used as modulators: indomethacin, a blockator of cyclooxygenase way of arachidonic acid metabolism; quercetin and linoleil of hydroxamic acid, blockators of lipoxygenase way of arachidonic acid metabolism; taurine, an antihypoxant and energy source under hypoxic conditions; lipin - antihypoxant with significant membrane protective effect. It was shown, that the respiration intensity of tissue homogenate, not only of its mitochondrial fraction, closely connected with structural organization of mitochondria. It was demonstrated that changes of O<sub>2</sub> concentration in gas mixture lead to the alteration of interrelation between O<sub>2</sub> consumption and stereometric characteristics of mitochondria: in normoxia the intimate correlation was established with number of mitochondria and its total surface; in hypoxia such correlation was established with mitochondria diameter and number of structurally damage organelles. Pharmacological modulation factors play in this process not so significant role.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бровкович В.М., Мойбенко А.А., Бутович І.А. и др. Влияние липоксигеназных производных линолевой кислоты на функциональную активность нейтрофилов // Укр. биохим. журн. – 1996. – 68, № 3. – С. 79–84.
2. Вейбель Э.Р. Морфометрия легких человека: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1970. – 176 с.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М., 1972. – 252 с.
4. Емельянов Н.А. Измерение выделения или поглоще-

5. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. – К.: Вища школа, 1984. – 204 с.
6. Коцюруба В.Н., Мойбенко А.А. Коррекция уровня пептидлейкотриенов – медиаторов ишемии и шока // Физиол. журн. – 1989. – 35, № 1. – С. 94–103.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
8. Митин К.С. Структура митохондрий в норме и патологии. – В кн.: Митохондрии. Биохимия и морфология. – М.: Наука, 1967. – С. 98–106.
9. Осипов В.П., Лукьянова Е.М., Антипкин Ю.Г. и др. Современная технология статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях. – К.: ИНТЕРЛИНК, 2003. – 104 с.
10. Раевский К.С. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты. – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
11. Середенко М.М., Дударев В.П., Лановенко И.И. и др. Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии. – К.: Наук. думка, 1987. – 200 с.
12. Середенко М.М., Розова Е.В., Стефанов С.А. и др. Аэрогематический барьер легких при острой гипоксической гипоксии под влиянием липосом // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1988. – 94, № 2. – С. 63–67.
13. Ташке Э. Введение в количественную цитогистологическую морфологию: Пер. с рум. – Бухарест: Изд-во АСРР, 1980. – 192 с.
14. Hamer R.R., Tegeler J.J., Kurtz E.S. et al. Diben-zoxepinone hydroxylamines and hydroxamic acids: dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase with potent topical antiinflammatory activity // J. Med. Chem. – 1996. – 39, № 1. – P. 246–252.
15. Hoppeler H., Fluck M. Plasticity of Skeletal Muscle Mitochondria: Structure and Function // Med. Sci. Sports Exerc. – 2003. – 35, № 1. – P. 95–104.
16. Hussey H.J., Tisdale M.J. Inhibition of tumour growth by lipoxygenase inhibitors // Brit. J. Cancer. – 1996. – 74, № 5. – P. 683–687.
17. Wright S.W., Harris R.R., Kerr J.S. et al. Synthesis, chemical, and biological properties of vinyllogous hydroxamic acids: dual inhibitors of 5- lipoxygenase and IL-1 biosynthesis // J. Med. Chem. – 1992. – 35, № 22. – P. 4061–4068.

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

*Матеріал надійшов до редакції 21.06.2005*