

О. О. Гончар, К. В. Розова, М. М. Середенко

## Вплив модуляторів активності калієвих каналів на морфофункціональний стан лізосом при гострій гіпоксичній гіпоксії

*Изучали влияние фторсодержащих аналогов тинацидила (веществ ПФ-5 и ПФ-10), являющихся активаторами калиевых каналов, на морфофункциональное состояние лизосом в ткани легкого и сердца - органов, играющих ведущую роль в функционировании кислородобеспечивающих систем организма. Исследования были проведены на белых половозрелых крысах-самцах в условиях острой (30 мин) гипоксической гипоксии (7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>). Применение ПФ-5 и ПФ-10 в условиях острой гипоксической гипоксии приводило к морфофункциональным изменениям в лизосомальной системе, которые сопровождались снижением уровня ферментемии. Это, в определенной степени, можно объяснить увеличением образования связанной формы ферментов, которая является функционально латентной и, как следствие, уменьшением выхода ферментов в кровь в экстремальных условиях.*

### ВСТУП

Дослідженнями останніх років показано, що у змінах морфофункціонального стану біологічних мембран, а відтак і клітинних органел, провідну роль відіграють концентрації внутрішньоклітинного калію. Причому у разі збільшення виходу калію з клітини порушується процес відновлення макроергічних фосфатів, що може супроводжуватися порушенням структури та функції біологічних мембран, а при підвищенні в клітині концентрації іонів калію змінюється мембранна проникність і спостерігаються прояви набряку клітинних органел і клітин у цілому [2,3,11]. Процес транспорту калію безпосередньо пов'язаний з функціональним станом калієвих каналів, зміна якого відбувається під впливом різних факторів і, зокрема, при розвитку гіпоксичних станів організму [3,9,15]. За умов гіпоксії важливе значення мають АТФ-залежні калієві канали, оскільки при нестачі кисню істотно змінюється енергетичний обмін в організмі [8,12,14]. З іншого боку, за та-

ких умов спостерігається значна активація деструктивних аутофагічних процесів у клітинах, безпосередню участь у яких беруть лізосоми [13] - клітинні органели, стан яких також залежить від внутрішньоклітинного обміну калію.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу модифікації активності калієвих каналів за умов гострої гіпоксичної гіпоксії на морфофункціональний стан лізосом у тканині легень і серця, органів, що відіграють провідну роль у функціонуванні киснезабезпечуючих систем організму.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено на щурах-самцях масою 170 - 220 г. Гостру гіпоксичну гіпоксію моделювали, даючи щурам дихати протягом 30 хв газовою сумішшю, яка складалась з 7% O<sub>2</sub> і 93% N<sub>2</sub>.

Досліджувані модулятори активності калієвих каналів (активатори) ПФ-5 та ПФ-10 (синтезовані в Інституті органічної хімії

НАНУ фторвмісні аналоги пінацидилу) вводили щурам внутрішньочеревно у дозі 0,06 мг/кг за умов нормоксії або за 30 хв до початку гіпоксичного впливу.

Дослідні тварини були розподілені на шість груп (по 8 - 10 щурів у групі): I - контрольні тварини; II - тварини, яких піддавали гіпоксичному впливу; III - тварини, яким за умов нормоксії вводили речовину ПФ-5; IV - тварини, яким ПФ-5 вводили перед гіпоксичним впливом; V - тварини, яким за умов нормоксії вводили речовину ПФ-10; VI - тварини, які перед гіпоксичним впливом вводили речовину ПФ-10.

Для оцінки стану лізосом готували за стандартною методикою [10] гомогенати серця і легень, у яких виявляли вільну, зв'язану та загальну (при наявності 0,1% тритону X-100) активність маркерних лізосомальних ферментів: кислій фосфатази (КФ) і катепсину Д (КД). Активність цих самих ферментів досліджували у сироватці крові. Активність лізосомальних ферментів визначали за допомогою спектрофотометричних методів [15]. Стан лізосомальних мембран оцінювали за змінами відношення вільної активності ферментів до загальної їх активності [4].

З метою морфологічної оцінки стану лізосомального апарату в клітинах легень і серця за допомогою електронного мікроскопу досліджували зразки тканин, які готували за загальноприйнятими методами [7]. Після зневоджування у спиртах, подвійної фіксації  $\text{OsO}_4$  і глотаральдегідом і заливки у епон-аралдит, виготовляли ультратонкі зрізи товщиною 40 - 60 нм, які обробляли ураніацетатом і цитратом свинцю й вивчали за допомогою електронного мікроскопу JEM 100 CX (Японія).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень показали, що гіпоксична гіпоксія призводила до активації лізосомального апарату клітин серця та легень, що виражалось у підвищенні всіх видів активності КФ та КД відносно контролю (табл. 1, 2).

Показник стану лізосомальних мембран - відношення вільної активності ферменту до загальної - для КФ збільшувався при гіпоксії у 1,5 раза, для КД - у 1,7 - 1,9 раза, що свідчить про деяку лабілізацію лізосомальних мембран. Усі ці зміни супроводжувалися появою у крові КД та збільшенням концентрації КФ (табл. 3).

При електронно-мікроскопічному дослідженні тканини легень та серця за умов гострої гіпоксичної гіпоксії виявили збільшення загальної кількості лізосом у 1,5-2 рази. Підвищення їх кількості однаковою мірою стосувалось як первинних, так і вторинних лізосом, переважно аутофагічного типу. Слід зазначити, що майже всі лізосоми, які спостерігалися, були розміщені у безпосередній близькості від мітохондрій (кількість яких також збільшувалася при гіпоксії). У обох органел у ділянках, які близько розташовані одна від одної, мембрани найчастіше не мали чіткого окреслення (рисунок, а). Деякі автори вважають [4,6], що лізосоми можуть бути пусковим механізмом для посилення поділу та синтезу мітохондрій, сприяючи оптимізації енергопродукції клітин за умов екзогенних впливів. З цієї точки зору можна вважати знайдену лабілізацію лізосомальних мембран однією з пристосувальних реакцій на вплив гострої гіпоксичної гіпоксії.

Застосування активаторів калієвих каналів ПФ-5 і ПФ-10 за умов гіпоксії показало, що в тканині міокарда вільна активність КФ знижувалася у 1,3 та 1,7 разів, КД - у 1,5 та 1,2 рази відповідно порівняно зі станом гострої гіпоксії. Це спостерігалось у разі паралельного підвищення зв'язаної та загальної активності КФ, що відбувалося внаслідок перерозподілу вільної та зв'язаної форми ферменту (див. табл.1, 2). Показник модифікації лізосом був у 2 - 2,3 раза меншим, ніж за умов "чистої гіпоксії", що свідчить про активацію лізосомального апарату без ознак його деструкції [4].

Слід зазначити, що за умов гіпоксичної гіпоксії при застосуванні ПФ-5 відмічалось збільшення зв'язаної форми лізосомальних

**Таблиця 1. Активність кислої фосфатази (мкмоль·хв<sup>-1</sup>·г<sup>-1</sup> тканини) у тканинах міокарда та легень щурів при застосуванні речовин ПФ-5 та ПФ-10 (M ± m)**

Умови досліджу	Відношення активності вільної до загальної	Активність ферменту		
		загальна	вільна	зв'язана
<b>Міокард</b>				
Контроль	0,12	0,022±0,001	0,0027±0,0001	0,019±0,001
Гіпоксія	0,16	0,027±0,002*	0,0043±0,0003*	0,028±0,002*
Введення ПФ-5	0,13	0,019±0,002	0,0029±0,0001	0,016±0,001
Введення ПФ-5 і гіпоксія	0,08	0,045±0,003*	0,0036±0,0001*	0,044±0,003*
Введення ПФ-10	0,15	0,032±0,001*	0,0048±0,0002*	0,027±0,002*
Введення ПФ-10 і гіпоксія	0,07	0,036±0,001*	0,0026±0,0001*	0,035±0,003*
<b>Легені</b>				
Контроль	0,11	0,039±0,002	0,0044±0,0001	0,034±0,001
Гіпоксія	0,16	0,045±0,003*	0,0071±0,0001*	0,039±0,001*
Введення ПФ-5	0,16	0,038±0,001	0,0062±0,0002*	0,033±0,001
Введення ПФ-5 і гіпоксія	0,13	0,052±0,002*	0,0070±0,0004	0,044±0,002*
Введення ПФ-10	0,14	0,042±0,003	0,0059±0,0001*	0,036±0,003
Введення ПФ-10 і гіпоксія	0,14	0,052±0,001*	0,0069±0,0002	0,045±0,003*

\* P &lt; 0,05 (тут і в табл. 2 і 3).

**Таблиця 2. Активність катепсину Д (ΔE 280) у тканинах міокарда та легень щурів при застосуванні речовин ПФ-5 та ПФ-10 (M ± m)**

Умови досліджу	Відношення активності вільної до загальної	Активність ферменту		
		загальна	вільна	зв'язана
<b>Міокард</b>				
Контроль	0,10	1,95±0,1	0,20±0,01	1,76±0,1
Гіпоксія	0,19	2,27±0,3	0,45±0,02*	1,82±0,2
Введення ПФ-5	0,15	1,34±0,4	0,20±0,03	1,14±0,2*
Введення ПФ-5 і гіпоксія	0,13	2,48±0,4	0,31±0,03*	2,42±0,2*
Введення ПФ-10	0,13	2,26±0,3	0,29±0,02*	1,97±0,1
Введення ПФ-10 і гіпоксія	0,16	2,36±0,4	0,39±0,02*	1,99±0,4
<b>Легені</b>				
Контроль	0,12	2,48±0,1	0,29±0,02	2,18±0,1
Гіпоксія	0,20	4,33±0,2*	0,87±0,02*	3,46±0,2*
Введення ПФ-5	0,11	2,92±0,4	0,31±0,03	2,62±0,1
Введення ПФ-5 і гіпоксія	0,16	3,76±0,1*	0,60±0,02	3,16±0,4
Введення ПФ-10	0,12	2,65±0,4	0,32±0,04	2,33±0,3
Введення ПФ-10 і гіпоксія	0,19	3,92±0,2*	0,75±0,02*	3,17±0,1

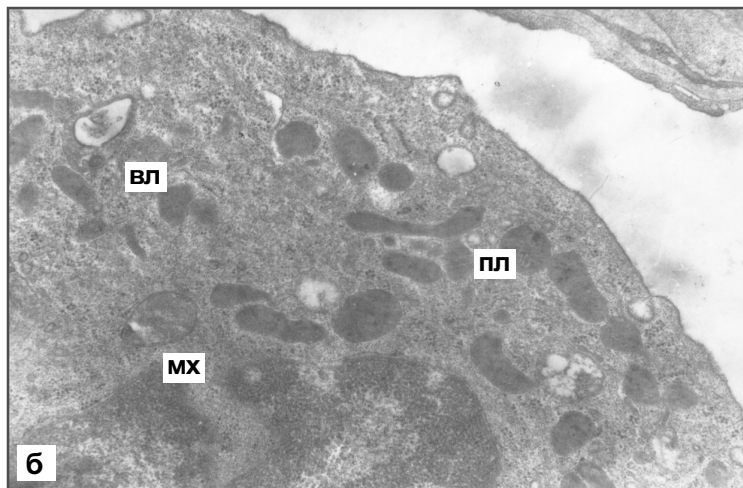
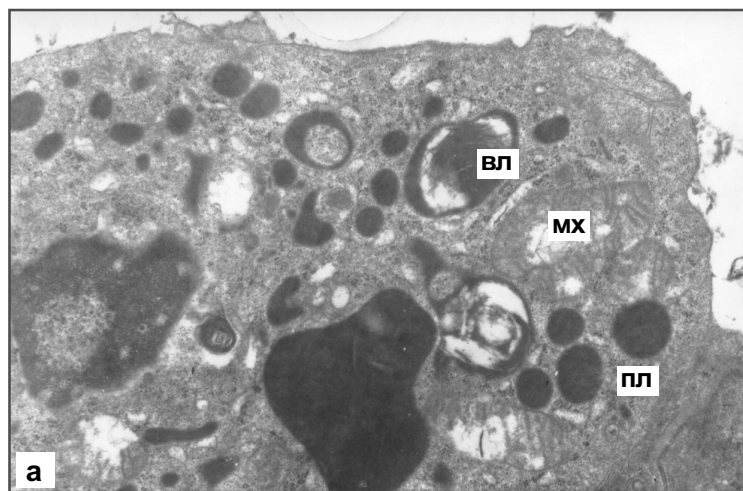
ферментів у клітинах міокарда для КФ - у 2 рази, для КД - у 1,3 рази, а у разі застосування ПФ-10 - для КФ - у 1,5 рази порівняно зі станом гострої гіпоксії.

У тканині легень за умов гіпоксії на тлі застосування ПФ-5 і ПФ-10 вільна активність КФ утримувалась у межах, що були характерні для стану гострої гіпоксії. Відмічалось

**Таблиця 3. Активність ферментів кислій фосфатази та катепсину Д у сироватці крові при застосуванні речовин ПФ-5 та ПФ-10 ( $M \pm m$ )**

Умови досліджу	Кисла фосфатаза, ммоль·год <sup>-1</sup> ·л <sup>-1</sup>	Катепсин Д, ΔЕ 280
Контроль	0,13 ± 0,01	0,005 ± 0,001 (сліди)
Гіпоксія	0,31 ± 0,03*	0,089 ± 0,001*
Введення ПФ-5	0,24 ± 0,01*	0,021 ± 0,002*
Введення ПФ-5 і гіпоксія	0,15 ± 0,02*	0,062 ± 0,001*
Введення ПФ-10	0,19 ± 0,01*	0,056 ± 0,002*
Введення ПФ-10 і гіпоксія	0,12 ± 0,01*	0,078 ± 0,003*

Примітка. \* -  $P < 0,05$ .



Стан лізосомального апарату клітин легеневої тканини при гострій гіпоксичній гіпоксії (а) та при сумісному впливі гіпоксії та модулятора активності калієвих каналів (б). Умовні позначення: МХ - мітохондрія, ПЛ - первинна лізосома, ВЛ - вторинна лізосома. Зб. а - 15000, б - 10000.

деяке підвищення загальної та зв'язаної активності ферменту, незначне зниження показника модифікації лізосом.

Проведені морфологічні дослідження дозволили встановити, що застосування препарату ПФ-5 призводить до певних змін у лізосомальному апараті досліджуваних клітин за умов гіпоксичної гіпоксії. У разі збереження підвищеної загальної кількості лізосом відбувався перерозподіл якісного складу у бік зменшення кількості вторинних і збільшення первинних лізосом (див. рисунок, б). Можна припустити, що застосування препарату сприяє зниженню активності катаболічних процесів у клітинах, про що опосередковано може свідчити і зменшення активності вільних лізосомальних ферментів (див. табл. 1, 2). Значна кількість зв'язаних форм ферментів, імовірно, зумовлена збільшенням кількості первинних лізосом за цих умов. Застосування препарату ПФ-10 у разі гострої гіпоксичної гіпоксії приводило до подібних змін лише у тканині міокарда.

Лізосомальна система клітин є однією з ланок ферментного захисту організму від дії екзоген-

них речовин [6]. Введення самих по собі досліджуваних сполук викликало неоднозначну реакцію з боку лізосомального апарату. Так, більш виражену реакцію - підвищення рівня КФ мали клітини легень на введення ПФ-5 та ПФ-10, клітини міокарда - на ПФ-10.

Таким чином, застосування аналогів пінацидилу ПФ-5 і ПФ-10 за умов гострої гіпоксичної гіпоксії призводило в тканинах легень і міокарда до морфофункціональних змін у лізосомальній системі досліджуваних клітин, що супроводжувалися зниженням рівня ферментемії. Це, до певної міри, можна пояснити підвищенням утворення зв'язаної форми ферментів, яка є функціонально латентною [4,6], і, як наслідок цього, зменшенням виходу ферментів у кров за екстремальних умов.

**O.A.Gonchar, K.V.Rozova, M.M.Seredenko**

#### **EFFECT OF K<sup>+</sup>-CHANNEL OPENERS ON MORPHOFUNCTIONAL LYSOSOMES STATE UNDER ACUTE HYPOXIC HYPOXIA**

It was studying the effect of fluorinecontain pinacidil analogs (PF-5 and PF-10), which are the K<sup>+</sup>-channel openers, on morphofunctional lysosomes state at lung and heart tissues. The investigation was made on white pubertal rat-males under acute (30 min) hypoxic hypoxia (7% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>). The application of PF-5 and PF-10 under acute hypoxic hypoxia leads in lung and myocardium tissues to morphofunctional changes of lysosome system in investigated cells, which were connected with decreasing of enzymemia. It, partly, may be explain by increasing of connected enzyme forms synthesis, because such forms are the functional latent, so the output of enzymes in blood under unfavourable conditions increased.

*A.A.Bogomoletz Instityte of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Баррет Д.А., Хит М.Ф. Лизосомальные ферменты. - В кн.: Лизосомы. Методы исследования. - М.: Мир, 1980. - С. 25-156.

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

2. Дворцин Г.Ф. Калий и противоишемическая защита миокарда // Пат.физиология и эксперим. терапия.- 1984. - Вып.4. - С. 86-90.
3. Капелько В.И., Титов В.Н., Новикова Н.А., Коткина Т.И., Малиновская К.И. Защитный эффект внеклеточного K<sup>+</sup> в миокарде при нарушении энергообразования // Кардиология.- 1983. - 23, № 3. - С. 14-20.
4. Панин Л.Е., Маянская Н.Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. - Новосибирск: Наука, 1987. - 196 с.
5. Покровский А.А. Биохимические методы исследований в клинике. - М.: Медицина, 1969. - 652 с.
6. Покровский А.А., Тутьельян В.А. Лизосомы. - М.: Наука, 1976. - 382 с.
7. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. - М.: Мир, 1975. - 324 с.
8. Харюкова Н.Л., Овсянников А.М., Фролов В.А. Изменение ультраструктуры миокарда перфузируемого сердца кролика при гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1984. - 98, № 10. - С. 496-499.
9. Auchampfch J.F., Gross G.J. Anti-ischaemic actions of potassium channel openers in experimental myocardial ischaemia reperfusion injury in dogs // Eur.Heart J. - 1993. - 14, Suppl B. - P. 10-15.
10. Bird J.W.C. Skeletal muscle lysosomes. - In: Lysosomes in Biology and Pathology. - Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1975. - 4. - P. 77-101.
11. Buchheit K.H., Fozard J.R. K<sub>ATP</sub> channel openers for the treatment of airways hyperreactivity // Pulmonary Pharnacol. & Therapeutics. - 1999. - 12. - P. 103-105.
12. Huang S.Y., Alexander J.K., Grover R.F. et al. Increased metabolism contributes to increased ventilation at high altitude // Respir. Physiol. - 1984. - 57, N 3. - P. 377-385.
13. Loegering P.J., Bonin M.Z., Smith J.J. Effect of exercise, hypoxia and epinephrine on lysosomes and plasma enzymes // Exp. and Med. Pathol. - 1975. - 22, N 2. - P. 242-251.
14. Theis J.G.W., You-an Lin, Coceni F. ATP-gated potassium channel activity of pulmonary resistance vessels in the lamb // Can. J. Physiol. Pharmacol. - 1997. - 75. - P. 1241-1248.
15. Weir E.K., Archer S.L. The mechanisms of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels // The FASEB Journal. - 1995. - 9. - P. 183-189.

*Матеріал надійшов до редакції 20.03.2001*