

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ІНСТИТУТ

На правах рукопису

ДРЕВАЛЬ Владислав Іванович

БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ РАДІАЦІЙНОЇ
ПОРАЗКИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН

03.00.04 - Біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Харків - 1994

Дисертація рукопис.

Робота виконана на кафедрі експериментальної ядерної фізики
Харківського Державного університету.

Науковий консультант: член-кореспондент АН України,
доктор фізико-математичних наук, професор
Ілля Іванович Залубовський

Офіційні опоненти: доктор фізико-математичних наук, професор
Крій Павлович Благий

доктор медичних наук, професор
Зєволод Іванович Губський

доктор біологічних наук, професор
Золодимир Йосипович Луговий

Провідна установа: Київський державний університет
ім. Тараса Шевченка

Захист дисертації відбудеться " 9 " червня 1994 р.
о 14⁰⁰ на засіданні спеціалізованої ради
Д 088.23.04 при Харківському медичному інституті (м. Харків-22,
пр. Леніна, 4).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Харківського
медичного інституту.

Автореферат розісланий 03.05.1994.

Вчений секретар
спеціалізованої ради

К.б.н. Д.О. Зубкова

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00756469 (.)

ДВ - 30.08

Актуальність проблеми. Одні з ґрунтовних питань у біології - адаптація до умов середовища, що постає важливим й однією з найхарактерніших властивостей живих систем будь-яких рівней організації на всіх етапах філогенезу [Анохін, 1975]. Загальні адаптаційні реакції постають реакціями всього організму і включають до себе всі його системи і рівні [Сельє, 1960; Хочачка, Сомеро, 1988]. Загальні адаптаційні реакції організму постають неспецифічними, тобто виникають у відповідь на дію різних за якістю подразників визначеної сили /дози/ [Насонов, 1959; Гаркаві та ін., 1990]. Неспецифічний адаптаційний синдром є необхідною ланкою багатьох патологічних процесів [Браун, Мокенко, 1987]. Інтерес до проблем неспецифічного адаптаційного синдрому обумовлений відкриттям та запровадженням до практики у теперішній час великого числа нових фізичних, хімічних та біологічних факторів, здатних негативно впливати на організм. Частково, все більша кількість людей, як відомо підпадає під вплив радіації. У зв'язку з цим великий інтерес викликає вивчення механізмів формування та розвитку неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи при діянні іонізуючого випромінювання на організм.

Мембранним компонентом клітин, в якому розгортається радіаційно-хімічні реакції, постають клітинні мембрани [Барабій та ін., 1991; Бурлакова та ін., 1989; Кудряшов, 1984]. Експериментально показано, що радіація викликає значні зміни фізико-хімічних властивостей як ліпідної фази [Коломійцева, 1989], так і білкових компонентів мембран [Fomenko et al., 1988], зміну структури мембрани [Edwards et al., 1984; Сунгуров, 1988]. Враховуючи те, що мембрани є структурною основою більшості функціональних систем клітин, слід чекати, що одним з прогностичних наслідків зміни структури мембран буде порушення механізмів інтеграції клітинного обміну під впливом радіації [Кузів, 1986]. У зв'язку з цим, звертають на себе увагу плазматичні мембрани клітин, що виконують важливу роль регулятора клітинного метаболізму [Богач та ін., 1981]. Однак, незважаючи на безперечний інтерес до вивчення ролі плазматичних мембран в адаптивних реакціях клітин до діяння радіації, [Фоменко, Акоев, 1984; Гискулова, 1986], до теперішнього часу не з'ясовано характер зміни складу, структури білкового та ліпідного компонентів плазматичної мембрани, їх взаємодії, зміни проникливості мембран та активності мембранозв'язаних ферментів. З зв'язку з цим дослідження структурно-функціональних змін плазматичних мембран пов'язаних із механізма-

ми радіочутливості клітин є актуальним сьогодні.

Мета та завдання роботи. Подана робота присвячена дослідженню характеру біохімічних і фізико-хімічних змін плазматичних мембран у реалізації неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи при опромінюванні. Метою даного дослідження є визначення основних закономірностей радіаційної модифікації структурно-функціонального стану плазматичних мембран клітин, що гануть по інтерфазному типу.

Завдання дисертаційної роботи:

- дослідження властивостей плазматичних мембран тимоцитів;
- з'ясування характеру структурно-функціональних змін плазматичних мембран тимоцитів в умовах гострого та фракціонованого опромінювання тварин;
- дослідження характеру структурно-функціональних змін плазматичних мембран при діянні радіації на тимоцити та еритроцити;
- вивчення особливості механізму поразки мембран при опромінюванні препарату плазматичних мембран;
- в умовах експериментальних моделей ($Fe +$ аскорбат) - індукovanого перекисного окислення ліпідів і білок-ліпідних комплексів ліпосом досліджувати механізми модифікації білок-ліпідних взаємодій і структурного стану мембранних компонентів.

Наукова новизна результатів. Результати виявлених закономірностей зміни біохімічних і структурно-функціональних властивостей плазматичних мембран клітин не тільки доповнюють та розширюють існуючі уявлення, але й віддзеркалюють нові досягнення у вивченні фізико-хімічних механізмів, які визначають зміни білкового та ліпідного компонентів плазматичних мембран, що вносить значний вклад у вивчення біохімічних аспектів неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи при діянні радіації. Нові результати та зроблені висновки мають принципове значення:

Вперше здійснено комплексне фізико-хімічне дослідження структурно-функціональних властивостей плазматичних мембран при діянні радіації на тварин, клітини та препарат мембран.

Сперше встановлена раніше невідома особливість Ca^{2+} -АТФази плазматичних мембран уражатися внаслідок прямого діяння радіації, тоді як Mg^{2+} -АТФази - внаслідок непрямого діяння.

Вперше показано, що діяння радіації або ($Fe +$ аскорбат) - індукovanого перекисного окислення ліпідів викликає відщеплення периферичних білків плазматичних мембран тимоцитів, що супроводжується зміною структури білок-ліпідного матрикса та зростанням

сольобілізації інтегральних білків.

Установлено, що ефект окислення SH- груп білків плазматичних мембран визначається як продуктами ліпопероксидації, також і продуктом радіолізу води етидр.

Вперше показано, що АТФ, а також іони Ca^{2+} та Mg^{2+} можуть при визначених умовах роботи радіозахисне діяння на Ca^{2+} -АТФазу, Mg^{2+} -АТФазу і структуру плазматичних мембран.

Показана роль ліпідів плазматичних мембран у реалізації ефекту іонізуючого випромінювання. Вперше було виявлено, що поразка анулярних ліпідів здійснюється прямим діянням радіації, а вільні ліпіди змінюються як внаслідок прямого діяння радіації, так і під впливом продуктів радіолізу води-радикалів OH^{\cdot} .

Приведені нові дані свідчать про кооперативні зміни, що торкаються структури плазматичних мембран під впливом радіації на клітину.

Теоретична і практична значущість роботи. Одержані результати мають важливе значення для з'ясування загальних принципів функціонування плазматичних мембран та їх структури. Знання цих принципів необхідно для успішного вивчення структурно-функціональних якостей плазматичних мембран клітини та їх ролі в організації метаболізму у клітині. Ці результати можуть бути використані в експериментальній біології при досліджуванні структури і функціонування мембранного апарату клітини.

Вивчення ролі плазматичних мембран у реалізації неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи під впливом радіації викликають істотний інтерес для теоретичної біології (містить дані для аналізу однієї з найважливіших якостей живого стану матерії - подразливості) і практичне (вивчення механізмів захисту організму від опромінювання). Ці результати можуть бути використані при вивченні структурно-функціональних змін мембранного апарату клітини під впливом різних фізичних та хімічних факторів.

Практичний інтерес мають отримані у роботі дані про модифікуючий вплив АТФ, Ca^{2+} і Mg^{2+} на структуру та ферментативну активність плазматичних мембран, що дозволяє ставити питання про використання їх як компонента радіопротекторів. Розроблені засоби оцінки впливу радіації на структурно-функціональні властивості плазматичних мембран були використані при випробуванні радіопротекторів.

Основні положення, що виносяться на захист.

I. Адаптаційна реакція організму під впливом радіації це процес,

що розгортається з бігом часу, при якому спостерігаються значні зміни біохімічних та фізико-хімічних властивостей плазматичних мембран тимоцитів: активності Ca^{2+} -АТФази і Mg^{2+} -АТФази, проникливості мембран для іонів Ca^{2+} , поверхневих властивостей тимоцитів, структури білків та мікров'язкості ліпідів. Різниця у динаміці властивостей плазматичних мембран тимоцитів тварин після гострого одноразового опромінювання та при фракціонованому опромінюванні нелетальними дозами дозволяють зробити висновки, що вони зумовлені характером адаптаційної реакції організму у залежності від дози опромінювання.

2. Генералізовані перебудови плазматичних мембран при неспецифічному адаптаційному синдромі клітинної системи внаслідок впливу радіації мають кооперативний характер, що обумовлює зміну проникливості для Ca^{2+} , поверхневих властивостей плазматичної мембрани, в'язкості ліпідної компоненти мембрани.

3. Структурна неоднорідність плазматичних мембран обумовлює під впливом радіації на мембрани неоднакову радіочутливість мембранних білків, поразковість Ca^{2+} -АТФази внаслідок прямого, а Mg^{2+} -АТФази внаслідок непрямого впливу радіації, зміни анулярних ліпідів внаслідок прямого, а вільних ліпідів - як внаслідок прямого впливу радіації, так і радикалів OH^{\bullet} .

4. Моделювання ефектів радіації за допомогою / Fe + аскорбат / - індукованого перекисного окислення ліпідів у плазматичних мембранах та вивчення взаємодії білків із ліпосомами дозволило одержати зіставлені з ефектом радіації зміни SH-груп мембранних білків, структури білків та в'язкості мембранних ліпідів, зміни зв'язування білків із ліпідами. Це дозволяє зробити висновки, що істотну роль в ефекті радіації на плазматичні мембрани грає зміна білок-ліпідних взаємодій.

Апробація роботи. Матеріали дисертації були подані на: Всесоюзній конференції "Нові напрямки біотехнології" /Пушино, 1988/; VI Всесоюзній конференції по спектроскопії біополімерів /Харків, 1982/; I Всесоюзному радіобіологічному з'їзді /Москва, 1989/; IV Всесоюзній конференції "Органічні льоїнофори та їх застосування у народному господарстві". /Харків, 1990/.

За матеріалами дисертації опубліковано 45 наукових робіт.

Об'єм та структура роботи. Дисертація викладена на 336 сторінках і складається із вступу, аналітичного огляду літератури, методичної глави, 7 глав викладу одержаних результатів та їх обговорювання, висновків, вказівника літератури, додатку. Робота

містять в собі 25 таблиці та 94 малюнки. Список цитованої літератури включає 380 бібліографічних джерел.

Матеріали і методи дослідження.

Матеріалом для експериментальної роботи був тимус шурів-самців популяції "Зістар" /масою 100-120 г / та великої рогатої худоби, еритроцити донорської крові.

Плазматичні мембрани тимоцитів виділяли за методом [Древаль, Назаренко, 1991]. Чистоту фракції контролювали електроно-мікроскопічно і по активності маркерних ферментів: 5' - АТФазі, сукцинатдегідрогенази, кислої фосфатази, глюкозо-6-фосфатази НАДН-редуктази. Активність Ca^{2+} -АТФазі і Mg^{2+} -АТФазі у плазматичних мембранах визначали за методом *Carafoli* (1984). Електроліз білків проводили у 7,5 % поліакриламідному гелі [Древаль, 1977]. Концентрацію білка визначали за методом *Lowry et al.* /1951/. Інтенсивність перекисного окислення ліпідів /ПОЛ/ визначали по нагромадженню малонового діальдегіду /МДА/ [Владиміров, Арчаков, 1972].

У роботі використані наступні хіміко-аналітичні методи: виділення фосфоліпідів [Кейтс, 1975], двохмірної тонкошарної хроматографії фосфоліпідів на пластинках "Silufol UV-254" [Шаршунова та ін. 1980], кількісного визначення SH-груп [Кочетов, 1971] і неорганічного фосфата /Фн/ [Lowry, Lopez 1946]..

Стан структурних властивостей плазматичних мембран оцінювали, коли досліджували флуоресцентні характеристики зондів: 1-анілінонафталин - 8 сульфоната /АНС/, еозина, родаміна 6Ж, піроніна, 4-діметиламінохалкона, 3-метоксибензантронна [Владиміров, Добрецов, 1980 на спектрофлуориметрі "Hitachi MPF - 2A" (Японія). Відносну мікрів'язкість анулярних та вільних ліпідів визначали за допомогою флуоресцентного зонду пірена [Літвінов, Образцов, 1982]. Оцінку конформаційного стану мембранних білків проводили методом селективного гасіння власної триптофанової флуоресценції [Лаквич, 1986; Демченко, 1988].

Кальцій-зв'язувачу здібність плазматичних мембран досліджували із використанням ^{45}Ca і за допомогою Ca^{2+} - хелатуючого флуоресцентного зонду хлортетрацикліна [Дев'я та ін. 1980]. Досліджували здібність плазматичних мембран тимоцитів для кальція досліджували із використанням ^{45}Ca і металевохромного барвника арсенасо [Орлов, Лобас, 1989]. Визначення пов'язування сульфогалейного барвника бромтімолowego синього із плазматичними мембранами про-

водили за методом [Левін, 1976] .

Електрохімічну стабільність мембран еритроцитів визначали за методом [Дутвінський та ін. 1983] .

Ліпосоми формували із фосфоліпідів шляхом озвучування ліпідної суспензії за допомогою диспергатора УЗДН-І при частоті 22 кГц протягом 5 хвилин з наступним віддаленням багаточарних везикул центрифугуванням при 30000 g 30 хвил. [Nishijo et al. , 1983] . Реакцію комплексотворення метгемоглобіну та феріцитохрома С із ліпосомами проводили в 0,01 M тріс-HCl буфері pH 7,4. Бішарні ліпідні мембрани формували на отворі діаметром 1 мм у тefлоновій перегородці із суміші фосфатиділсеріна і фосфатиділхоліна у гептані [Богуславський, 1978] .

Гостре опромінювання шурів, клітин і мембранних препаратів здійснювали на лінійному прискорювачі електронів енергією 5 МeВ. Фракціоноване гамма-опромінювання шурів здійснювали на ізотопній установці "Исследователь"/⁶⁰Co /.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили із використанням t-критерія Ст'юдента, величину коефіцієнта кореляції (r) і коефіцієнта варіації обчислювали за методом [Сакс, 1976] .

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

І. Властивості плазматичних мембран тимоцитів.

Встановлено, що плазматичні мембрани тимоцитів володіють центрами сорбції як для АТФ, також і для кальція /Табл. І/.

Таблиця І.

Характеристика центрів сорбції АТФ і Ca²⁺ плазматичними мембранами тимоцитів.

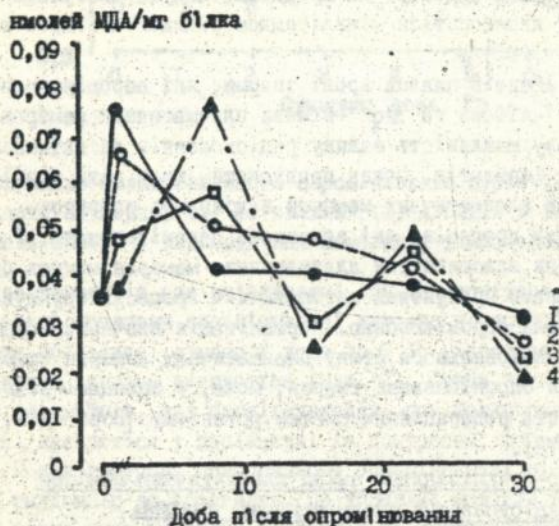
центр зв'язування	параметр зв'язування	N, молей/г білка	Ka, M ⁻¹	ΔG°, кДж/моль
Ca ²⁺ - сполучний	1	3,45 · 10 ⁻⁴	2,34 · 10 ⁵	-28,5
"-"	2	4,55 · 10 ⁻³	7,64 · 10 ²	-15,3
АТФ - сполучний	1	30,0 · 10 ⁻⁶	0,76 · 10 ⁶	-33,6
"-"	2	2,58 · 10 ⁻³	1,02 · 10 ³	-17,2

Зміна концентрації АТФ і Ca²⁺ можуть ефективно впливати на структуру плазматичних мембран шляхом зміни поверхневого потенціалу мембрани та в'язкості мембранних ліпідів. Плазматичні мембрани тимоцитів мають ефективні бар'єрні властивості: проходження іонів Ca²⁺ крізь мембрану за градієнтом концентрації це простий дифузій-

ний процес. Активний транспорт Ca^{2+} проти градієнту концентрації здійснюється Ca^{2+} -АТФазою з $K_m = 4,0 \text{ мМ}$, $V_{\text{max}} = 270,3 \text{ нмоль Фн/мг білка/хвнл}$. Алостеричним ефектором Ca^{2+} -АТФази постає Mg^{2+} вільний /коефіцієнт Хіла $0,1/$. Вивчення властивостей Mg^{2+} -АТФази показало, що $K_m = 2,34 \text{ мМ}$, $V_{\text{max}} = 498,0 \text{ нмоль Фн/мг білка/хвнл}$. Іони Mg^{2+} вільн. постають безконкурентними інгібіторами Mg^{2+} -АТФази. Фосфоліпіди мембран містять у собі: 55 % фосфотиділхоліну, 22 % фосфотиділстаноламіну, 23 % сфінгоміліну 9 % кардіоліпіну та 6 % фосфотиділінозиту.

2. Структурно-функціональні зміни плазматичних мембран тимоцитів після одноразового опромінення тварин.

Щурів опромінювали у дозах 1,5; 4,0; 7,0 і 10,0 Гр, на 1, 8, 15, 22 і 30-у добу після опромінення у плазматичних мембранах тимоцитів визначали активність Ca^{2+} -АТФази і Mg^{2+} -АТФази, про-



Мал. 1. Післярадіаційні зміни ПОЛ у тимоцитах щурів, що опромінювалися. Відзначені: дози 1,5 Гр-1; 4,0 Гр-2; 7,0 Гр-3; 10,0 Гр-4.

включивість мембран для іонів Ca^{2+} інтенсивність ПОЛ, мікров'язкість анаулярних та вільних ліпідів, зв'язування АНС та іонів Ca^{2+} з

поверхнею мембрани, реєстрували конформаційні зміни мембранних білків при гасінні акріламідом триптофанової флуоресценції.

Дані, які отримали, дозволяють зробити висновок, що для процесу післярадіаційних змін плазматичних мембран тимоцитів характерні коливальні зміни всіх структурно-функціональних властивостей, які досліджувалися, що притаманно змінам параметрів організму при загальному адаптаційному синдромі [Соколовський, 1984]. Спостережена коливальна динаміка ЦОІ при опромінюванні тварин (Мал.І) відповідає фазам загального синдрому адаптації [Барабій, 1991] і може ініціювати мобілізацію відповідних реакцій організму.

Однак, динаміка змін вивчених параметрів виявляється різною. Відсутність кореляції ($r = 0.085$) між процесами пасивного прибуття Ca^{2+} у клітинку та активним його виведенням Ca^{2+} -АТФазою може обумовлювати зміну концентрації Ca^{2+} у клітині, що розглядається як одна з причин загибелі тимоцитів [Габай та ін. 1990]. Як проміжний ефект під впливом радіації на організм, можуть виступати радіотоксини, які переносяться міжклітинною рідиною або кров'ю [Кузін, Копилов, 1983].

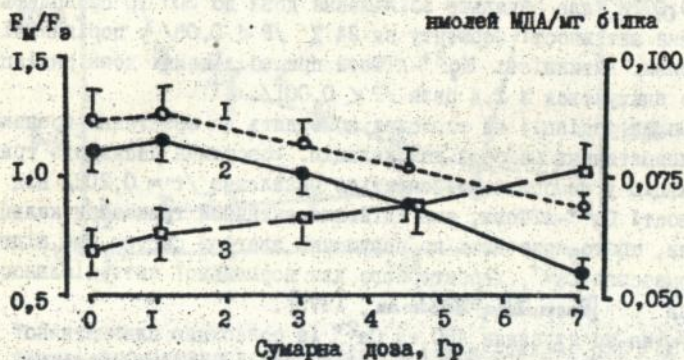
Дослідження ефектів плазми крові тварин, які опромінювалися, на активність Ca^{2+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази плазматичних мембран показало принципову можливість впливу радіотоксинів на активність мембранозв'язаних ферментів. Можна припускати, що у рані терміни зміни властивостей плазматичних мембран відбивають розвиток радіаційно-хімічних процесів, які викликані опромінюванням. У більш пізні терміни зміни властивостей плазматичних мембран можуть бути обумовлені токсичними продуктами автолітичних процесів зруйнування клітин, що підлягали опромінюванню. Нормалізація вивчених параметрів структурно-функціонального стану плазматичних мембран тимоцитів на 50-у добу після опромінювання тварин, може, у принципі відбивати реальну ефективність репараційних систем організму [Корогодін, 1966; Стрелін, 1978].

3. Структурно-функціональні зміни плазматичних мембран тимоцитів при фракціонованому опромінюванні тварин.

По теперішнього часу є дані про особливості змін у обміні речовин внаслідок багаторазового впливу нелетальних доз радіації [Дворецький, Сгорова, 1990; Кучеренко та ін., 1991]. Тому у наших експериментах досліджували зміну властивостей плазматичних мембран тимоцитів при щоденному опромінюванні тварин у дозі 0,5 Гр протягом двох тижнів.

Результати вивчення активності Ca^{2+} -АТФази показують, що

вплив радіації у сумарній дозі 3 Гр визиває зниження активності на 45 % / $P < 0,01$ / і подальше опромінювання не змінює активності ферменту. Активність Mg^{2+} -АТФази при опромінюванні в сумарній дозі 7 Гр приводить до зниження активності ферменту на 40 % / $P < 0,05$ / у порівнянні із тваринами, які не опромінювалися. При зростанні сумарної дози опромінювання відбувається зростання перекисидатії ліпідів (Мал. 2) та при сумарній дозі 7 Гр зростає на 45 % / $P < 0,05$ /. Зміна поверхневих властивостей плазматичних



Мал.2. Вплив фракціонованого опромінювання шурів на зміну мікро-в'язкості анулярних (1) та вільних (2) ліпідів і інтенсивності процесів ПОЛ(3) у плазматичних мембранах тимоцитів.

мембран тимоцитів при зв'язуванні АНС та структура мембранних білків при фракціонованому опромінюванні суттєво не змінюється. Разом із цим при збільшенні сумарної дози до 7 Гр мікро-в'язкість ліпідної компоненти мембран зникається (Мал. 2). Можна зазначити що більшість параметрів, які досліджувалися, при фракціонованому опромінюванні зникаються у порівнянні із контролем, що не опромінювався, тоді як при гострому одноразовому опромінюванні ці параметри мають тенденцію до зростання. Це дозволяє зробити висновки, що мають місце суттєві зміни у реакції плазматичних мембран тимоцитів при фракціонованому опромінюванні нелетальними дозами та при гострому одноразовому опромінюванні тварин. Зниження ефективності радіаційного впливу при фракціонуванні дози пояснюють репаративними процесами, які протікають у проміжках між опромінюваннями і частково усувають порушення [Акоєв, 1970].

4. Зміна властивостей плазматичних мембран під впливом радіації на клітини.

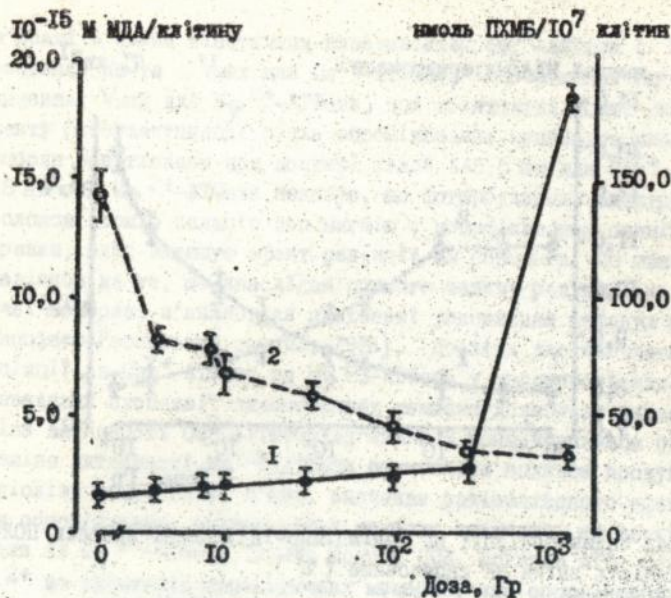
Для з'ясування особливостей реакції плазматичної мембрани у реалізації неспецифічного адаптаційного синдрому клітинної системи суспензії тимоцитів або еритроцитів опромінювали у дозах від 4 Гр до 10^4 Гр.

Встановлено, що активність Ca^{2+} -АТФази у плазматичних мембранах тимоцитів при дозі опромінювання 10 Гр зростає у 2 рази $/P < 0,001/$, але подальше збільшення дози до 300 Гр приводить до зникнення активності ферменту на 24 % $/P < 0,05/$ у порівнянні із контролем. Активність Mg^{2+} -АТФази при збільшенні дози радіації до 10^5 Гр знижується в 2,4 рази $/P < 0,001/$.

Вплив радіації на тимоцити приводить до зростання проникливості плазматичних мембран для кальцію. Зростання пасивного транспорту кальцію у тимоцити здійснюється незалежно $/r = 0,202/$ від зміни активності Ca^{2+} -АТФази, яка здійснює активний транспорт кальцію із клітини, тобто приводить до порушення злагоди систем, що підтримують гомеостаз Ca^{2+} , характерного для нормальної життєдіяльності клітини [Rasmussen, Goodman, 1979].

Зміна зв'язування АНС та Ca^{2+} із поверхнею плазматичної мембрани тимоцитів показує на зміни поверхневих властивостей плазматичних мембран клітин, що опромінювалися. Збільшення дози радіації приводить до зростання мікров'язкості ліпідів. Очевидно, зміни ліпідного компонента плазматичних мембран зумовлені процесами зростання ліпопероксидації при опромінюванні (Мал. 3) [Бурлакова, 1989]. Під впливом радіації на тимоцити структурна жорсткість мембранних білків у дозах до 300 Гр зменшується на 12 % $/P < 0,05/$, а при подальшому збільшенні дози до 10^5 Гр - зростає в 1,5 рази $/P < 0,01/$ у порівнянні із контролем, можливо, внаслідок денатураційних переходів.

Кількість SH-груп в білках плазматичних мембран у дозовому інтервалі до 300 Гр зменшується у 4,6 рази у порівнянні із тимоцитами, які не опромінювалися (Мал. 3). Відсутність кореляції $/r = 0,04/$ між змінами жорсткості мембранних білків і кількістю SH-груп робить малоімовірним припущення Sutherland /1967/, що зміна у структурі мембранних білків внаслідок опромінювання зумовлюється окисленням сульфгідрильних груп. При опромінюванні тимоцитів відзначаються кооперативні залежності від дози опромінювання для параметрів зв'язування кальцію із плазматичними мембранами, проникливості мембран для кальцію, в'язкості анулярних і



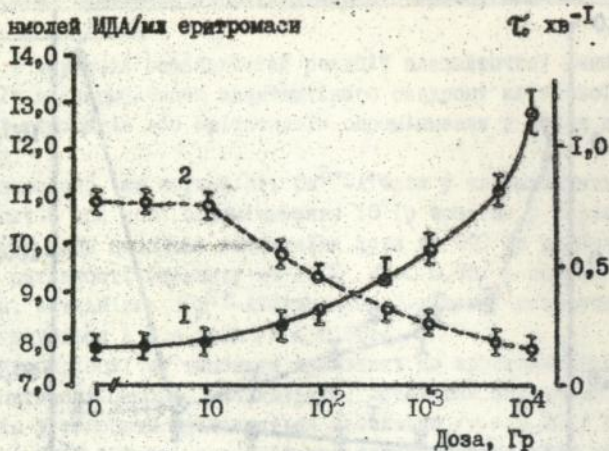
Мал.3. Вплив опромінювання тимоцитів на інтенсивність ПОМ /1/ і вміст SH-груп білків плазматичних мембран /2/.

незалежних ліпідів. При цьому величина коефіцієнту Хілла менше одиниці. Це дозволяє зробити висновок, що внаслідок впливу радіації на клітну кооперативні переходи торкається більшої частини структури плазматичних мембран.

З метою досліджування питання про зміну структурної цілісності плазматичної мембрани внаслідок впливу радіації досліджували електрохімічну стабільність плазматичних мембран еритроцитів /мал. 4/. Можна бачити, що при зростанні дози опромінювання проникливість плазматичних мембран еритроцитів для іонів Cl^- зростає. Спостереження паралельно із цим зростання інтенсивності ПОМ при збільшенні дози радіації, а також зміна стабільності мембран от /Fe + аскорбат/ - залежного ПОМ /Смєць та ін. 1990/ вказує на зміну ліпідної компоненти мембрани як ведучого механізму зміни електрохімічної стабільності плазматичних мембран еритроцитів.

5. Вплив радіації на плазматичні мембрани.

Для зрозуміння механізмів змін, що виявлені при опромінюванні клітин, були проведені дослідження при опромінюванні в дозах до



Мал. 4. Вплив радіації на радіаційно-індуцovanі процеси ПОЛ(I) і швидкість зміни рН середовища (τ).

10^4 Гр суспензії плазматичних мембран тимоцитів.

Встановлено, що вплив радіації приводить до відщеплення периферичних білків, зростання сольобілізації інтегральних білків тритоном X-100, зміни білкового складу за даними диск-електрофорезу. Гасіння власної флуоресценції мембраних білків із використанням акріламідом показує, що опромінювання у дозах до 10^2 приводить до незначного зниження структурної жорсткості мембраних білків. Разом з цим, при дозах до 10^4 структурна жорсткість мембраних білків зростає, можливо, у зв'язку з денатураційними змінами. Використання в якості гасників власної флуоресценції білків АТФ, Ca^{2+} , Mg^{2+} дало змогу встановити, що білки які пов'язують відповідні ліганди, володіють вищою радіорезистентністю, у порівнянні з пулом білків, які тітруються акріламідом.

Використання флуоресцентного зонду АНС дозволило встановити, що під впливом радіації відбувається збільшення негативного заряду мембран, можливо, у зв'язку з відщепленням периферичних білків, що постають полікатионами. Дані по вивченню зв'язування АНС, в'язкості ліпідів та просторових взаємовідносин між білками і ліпідами у присутності Ca^{2+} дозволяють робити висновки, що останній може робити радіозахисний вплив на структуру плазматичних мембран.

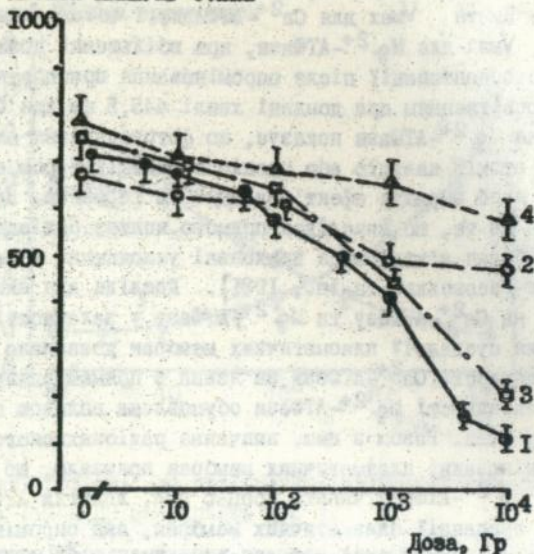
Очевидно, зі змінами структури білків внаслідок опромінювання

зв'язані і зміни кінетичних властивостей Ca^{2+} -АТФази і Mg^{2+} -АТФази: зростання K_m та V_{max} для Ca^{2+} -АТФази, і збільшення K_m та зниження V_{max} для Mg^{2+} -АТФази, при збільшенні дози. Вивчення ефекту фотореактивації після опромінювання препарату плазматичних мембран освітленням при довжині хвилі 445,5 нм для Ca^{2+} -АТФази і 518 нм для Mg^{2+} -АТФази показує, що фотозбудження електронних оболонок атомів кальцію або магнію є модифікатором променевої поразки, який зменшує ефект радіації на ферменти. Це може служити вказівкою на те, що внаслідок прямого впливу радіації на плазматичні мембрани з'являються приховані ушкодження молекул білків [Тимофєєв-Ресовський та ін., 1981]. Досліди для вивчення ефекту радіації на Ca^{2+} -АТФазу та Mg^{2+} -АТФазу у залежності від ступеня розведення суспензії плазматичних мембран дозволило вивести, що зміна активності Ca^{2+} -АТФази зв'язана з прямим впливом радіації, а зміна активності Mg^{2+} -АТФази обумовлена впливом продуктів радіолізу води. Разом з цим, вивчення радіозахисного ефекту іонула при опромінюванні плазматичних мембран показало, що ефективний вплив на Mg^{2+} -АТФазу чинить процес ПОЛ. Додатки АТФ, Ca^{2+} або Mg^{2+} до суспензії плазматичних мембран, яка опромінювалася, приводить до зростання радіаційної стійкості Ca^{2+} -АТФази і Mg^{2+} -АТФази, що підтверджують дані адсорбційного механізму захисту [Ейдус, 1972].

Експерименти із введенням перед опромінюванням до мембран іонулу, цистаміну або етанолу дозволили зробити висновок, що у процесі радіаційно-індуцovanого окислення SH-груп визначний внесок належить процесам ПОЛ /Мал. 5/. Вивчення радіаційно-індуцovanих ефектів у плазматичних мембранах, суспендованих в D_2O рН 4,0, 7,0 або 10,0 дозволяє робити висновки, що окислення SH-груп у мембраних білках зумовлено як процесами ліпопероксидації, так і e^- гідр.

Зростання інтенсивності ПОЛ під впливом радіації /Мал. 6/ супроводжується змінами у фосфоліпідному складі. Найбільш радіочутливим постає фосфотидилетаноламін, у той же час фосфатидилсерин і фосфатидилінозит постають більш радіостійкими - їх вміст достовірно змінюється при дозах більше 10^5 Гр. Зниження вмісту фосфатидилхоліну на 11 % / $P < 0,05$ / спостерігається при дозах більше $5 \cdot 10^5$ Гр. Для сфінгомієліну на всьому дозовому інтервалі достовірно змін не зареєстровано. Певно, ці процеси обумовлюють зміну в'язкості мембраних ліпідів /Мал. 7/. Досліди з розведенням, а також із вивченням впливу на ПОЛ цистаміну, етанолу та іонулу

нмоль SH-групп/мг білка



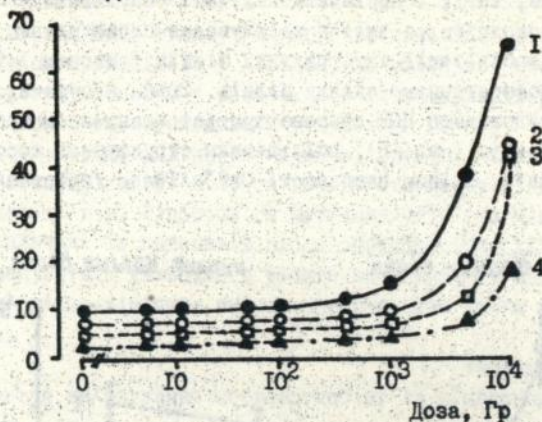
Мал. 5. Вплив іонізуючого випромінювання на вміст SH-груп у мембранних білках /1/, у присутності цистаміну /2/, етанолу /3/, іонола /4/.

(Мал. 6), ефектів D_2O pH 4,0, 7,0 або 10,0 дозволяють висновити, що під впливом радіації на плазматичні мембрани зміни в'язкості анулярних ліпідів відбуваються внаслідок ліпопероксидації, індукованої прямим впливом радіації, а для вільних ліпідів - як за рахунок прямого впливу радіації, так і продуктів радіолізу води радикалів OH^\bullet .

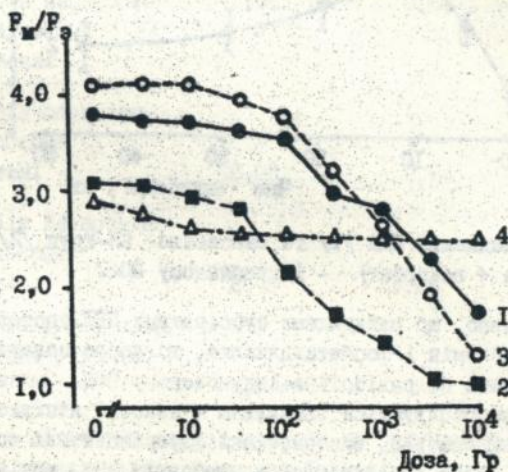
6. Вплив ПОМ на структурно-функціональні властивості плазматичних мембран.

Установлені вище зміни властивостей плазматичних мембран у значній мірі обумовлені змінами процесів перекисного окислення ліпідів [Полівода та ін., 1990]. У відповідності з цим було доцільно провести дослідження властивостей плазматичних мембран тимочитів під впливом /Fe + аскорбат/ - індукованого ПОМ [Ладя-

високої МДА/мг білка



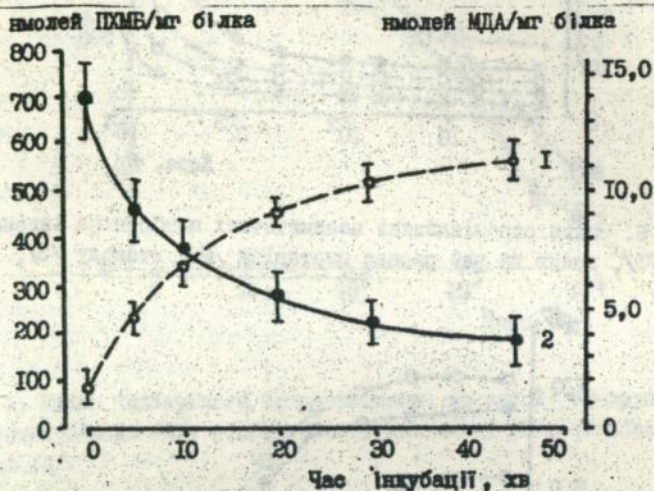
Мал. 6. Вплив опромінення плазматичних мембран на інтенсивність ПОЛ /1/, вплив на цей процес цистаміну /2/, етанолу /3/, іонолу/



Мал. 7. Вплив опромінювання плазматичних мембран на в'язкість ліпідів. Позначені: 1- анулярні, 2 - вільні ліпіди (концентрація мембран у суспензії 1,8 мг білка /мл); 3 - анулярні, 4 - вільні ліпіди (концентрація мембран 0,4 мг білка /мл).

миров, Арчаков, 1972] і порівняти отримані результати.

ПОЛ супроводжується зміною зв'язування периферичних білків, зростанням сольобілізації інтегральних білків триптоном λ -100 та зміною електрофоретичного складу білків. Зміни мембранних білків внаслідок індукованого ПОЛ супроводжуються зменшенням кількості титруємих SH-груп (мал. 8), збільшенням структурної жорсткості мембранних білків, зміною активності Ca^{2+} -АТФазы /зростання K_m та V_{max} /.



Мал. 8. Нагромадження МДА /1/ та окислення SH-груп /2/ мембранних білків при (Fe + аскорбат) - індукованому ПОЛ.

Установлено, що найкращими субстратами ПОЛ постають фосфатидилетаноламін і фосфатидилхолін, що добре погоджується з отриманими даними по радіаційно-індукваному ПОЛ. Зміни фосфоліпідного складу супроводжуються зниженням в'язкості ліпідної компоненти плазматичних мембран. Використання флуоресцентних зондів, які розрізняються своєю локалізацією у мембрані: АНС, еозина, родаміна 6Ж та піроніна показує на збільшення негативного заряду мембран внаслідок ПОЛ.

Порівняння одержаних даних із радіаційно-індукваним ПОЛ у плазматичних мембранах дозволяє твердити, що процеси ПОЛ грають значну роль у структурно-функціональних змінах мембран.

7. Дослідження білок-ліпідних взаємодій у ліпосомах.

З метою вивчення впливу радіації на взаємодії основних компонентів мембран-білків і ліпідів, як модельної системи, використовували ліпосоми у комплексі з метгемоглобіном або феричитохромом С та опромінювали у дозах до 10^4 Гр.

Установлено, що радіаційно-хімічні зміни у ліпосомах супроводжуються інтенсифікацією ПОМ, та зміною структури білків, що мають у своєму складі гем. Ліпосоми та метгемоглобін опромінювали у дозі 10^3 Гр та вивчали їх взаємодії після опромінювання (Табл. 2). Одержані результати дозволяють робити висновки, що найважливішу роль у радіоційно-хімічних змінах мембран грає зміна ліпідного компоненту.

Таблиця 2.

Параметри зв'язування метгемоглобіну із ліпосомами.

Компоненти комплексу	$K_a \cdot 10^2$ M^{-1}	$N \cdot 10^{-2}$	ΔG° , кДж/моль
Метгемоглобін неопромінюваний + ліпосоми неопромінювані	7,04	0,68	-16,25
Метгемоглобін опромінюваний + ліпосоми неопромінювані	6,20	0,84	-15,93
Метгемоглобін неопромінюваний + ліпосоми опромінювані	2,75	1,25	-13,92
Метгемоглобін опромінюваний + ліпосоми опромінювані	9,29	0,61	-16,94

Зміни у ліпідному складі ліпосом за рахунок збільшення негативного заряду шляхом введення фосфатидилсерину або кардіоліпіну супроводжується зменшенням числа центрів зв'язування метгемоглобіну і цитохрому С з ліпідним бішаром і зниження структурної жорсткості білків. В свою чергу зміни в комплексоутворенні білків з ліпосомами супроводжуються розривленням фосфоліпідного бішару і збільшенням вмісту води в області карбонільних груп фосфоліпідів.

Зиявлений ансамбль біохімічних змін та структурних перебудов

у плазматичних мембранах внаслідок впливу радіації значно розширюють нашу уяву про будову плазматичних мембран і дозволяють краще зрозуміти молекулярні механізми зміни плазматичних мембран як компонента загальної неспецифічної адаптаційної реакції клітинної системи під впливом радіації.

Висновки.

1. Охарактеризовано білковий та ліпідний склад, кінетичні параметри Ca^{2+} -АТФази і Mg^{2+} -АТФази, Ca^{2+} -сполучні і АТФ-сполучні властивості плазматичних мембран тимоцитів та їх проникливості для іонів Ca^{2+} .
2. Установлені основні закономірності зміни плазматичних мембран тимоцитів у процесі загальної неспецифічної адаптаційної реакції після гострого одноразового опромінювання організму:
 - коливальні взаємозалежні зміни активності Ca^{2+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази;
 - взаємозалежність зміни систем активного транспорту Ca^{2+} -АТФазою та пасивної проникливості мембран для кальцію;
 - для ліпідного компоненту мембран характерні фазні зміни мікров'язкості анулярних та вільних ліпідів, інтенсивності ПОЛ;
 - структурні зміни плазматичних мембран характеризуються стадійними перебудовами поверхневих властивостей мембран та структурних змін мембранних білків;
 - плазма крові тварин, які опромінювалися, чинить вплив на активність Ca^{2+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази плазматичних мембран тимоцитів.
3. Установлені особливості змін плазматичних мембран тимоцитів при фракціонованому опромінюванні тварин нелетальними дозами:
 - відсутність різновиражених коливальних змін активності Ca^{2+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази;
 - зростання інтенсивності ПОЛ та зникнення в'язкості анулярних та вільних ліпідів;
 - відсутність суттєвих змін у поверхневих властивостях плазматичних мембран та структурній динаміці мембранних білків.
4. Визначені особливості зміни плазматичних мембран при неспецифічному адаптаційному синдромі клітинної системи внаслідок впливу радіації:
 - в основі зміни плазматичної мембрани під впливом радіації лежать зміни структури мембранних білків та ліпідів, активності

Ca^{2+} -АТФази і Mg^{2+} -АТФази;

- при досягненні порогового рівня впливу радіації генералізовані перебудови плазматичних мембран тимоцитів носять кооперативний характер, що обумовлює зміну проникливості плазматичних мембран для іонів Ca^{2+} , процесів зв'язування кальцію із поверхнею мембрани, в'язкості ліпідної компоненти мембрани;
 - електрохімічна стабільність плазматичних мембран еритроцитів змінюється внаслідок радіаційно-індуцьованого ПОЛ.
5. Установлені поліфункціональні зміни білків і ліпідів під впливом радіації на плазматичні мембрани:
- зміна кінетичних характеристик Ca^{2+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази;
 - білки плазматичних мембран тимоцитів характеризуються індивідуальною радіочутливістю;
 - зміни мембранных білків здійснюються як внаслідок прямого впливу радіації, так і внаслідок впливу продуктів ПОЛ і $\text{e}^-_{\text{гдр}}$;
 - зміна білок-ліпідних взаємодій приводить до відщеплення периферичних білків, зміна поверхневих властивостей мембран та зростання солубілізації інтегральних білків;
 - зміни ліпідного компоненту характеризуються зростанням ПОЛ, зменшенням відносного вмісту ФЕА, ФС та ФІ, зниженням мікро-в'язкості анулярних та вільних ліпідів;
 - зміни анулярних фосфоліпідів обумовлені прямим діянням радіації, а вільних ліпідів - як за рахунок прямого впливу, так і за рахунок впливу радикалів OH^\bullet .
6. Низькомолекулярні ліганди /АТФ, іони Ca^{2+} , Mg^{2+} / та D_2O чинять радіомодифікуючий ефект шляхом впливу на білковий та ліпідний компоненти плазматичної мембрани.
7. Використання білок-ліпідних комплексів ліпосом і (Fe + аскорбат) індуцьованого перекисного окислення ліпідів дозволяє зробити висновок, що важливу роль у структурно-функціональних змінах мембран під впливом радіації відіграють ефекти зміни білок-ліпідних взаємодій.

Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації:

1. Гиряк С.А., Дрезаль В.И., Товстяк В.В. модифіцированный бислой в качестве компонента биосенсора // Новые направления биотехнологии. Тезиси докл. Всес. конференції. - Пушчино, 1988. - С. 116.
2. Горбенко Г.П., Дрезаль В.И., Товстяк В.В. Спектрофото-

метрическое изучение кинетики взаимодействия метгемоглобина с модельными фосфолипидными мембранами // УІ Всес. конф. по спектроскопии биополимеров: Тез. докл. - Харьков, 1988. - С. 102.

3. Древалъ В.И., Финашин А.В., Баранник Е.А. Исследование связывания бромтимолового синего с плазматическими мембранами // Укр. биохим. журнал. - 1989, - Т. 61, № 2. - С. 94-98.

4. Бондарь И.Д., Древалъ В.И., Крупниъ З.Н., Курилко С.И., Ткаченко В.Н., Товстяк В.В. Структурно-функциональные изменения мембран эритроцитов при действии пучка электронов // I-й Всес. радиобиологический съезд: Тезисы докладов. Т. I. - Москва, 1989. - С. 54-55.

5. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. Взаимодействие метгемоглобина с фосфолипидными везикулами // Биополимеры и клетка. - 1990. - Т. 6, № 2. - С. 87-90.

6. Древалъ В.И., Финашин А.В. Влияние периферийных білків на активність Ca^{2+} -АТФазы плазматичних мембран тимоцитів // Укр. біохім. журнал. - 1990. - Т. 62, № 4. - С. 87-89.

7. Древалъ В.И., Гирник С.А. Влияние фотовозбуждения электронных оболочек атомов кальция и магния на АТФазную активность // Биофизика. - 1990. - Т. 36, № 4. - С. 552-554.

8. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. Флуоресцентные исследования изменения структуры метгемоглобина при взаимодействии с липосомами // Биофизика. - 1990. - Т. 36, № 6. - С. 925-927.

9. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. Зв'язання взаємодії феррицитохрому С з ліпосомами // Укр. біохім. журн. - 1990. - Т. 62, № 5. - С. 106-111.

10. Древалъ В.И., Горбенко Г.П. Влияние метгемоглобіну і феррицитохрому С на структуру ліпідного шару // Укр. біохім. журн. - 1990. - Т. 62, № 5. - С. 111-114.

11. Гирник С.А., Древалъ В.И. Влияние ионов кальция на флуктуация проводимости бислоиных липидных мембран // Биологические мембраны. - 1990. - Т. 7, № 5. - С. 540-542.

12. Древалъ В.И., Горбенко Г.П. Изучение взаимодействия метгемоглобина и феррицитохрому С с модельными фосфолипидными мембранами методом флуоресцентных зондов // IУ Всес. конф. "Органические люминофоры и их применение в народном хозяйстве": Тез. докл. - Харьков, 1990. - С. 79.

13. Емец Б.Г., Кондратенко С.И., Древалъ В.И. Исследование электрохимической стабильности мембран эритроцитов // Научные доклады высшей школы. Биол. науки. - 1990. - № 11. - С. 48-47.

14. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. Изучение взаимодействия метгемоглобина с отрицательно заряженными липосомами // Доп. ВИНТИ № 51:2-390 от 24.09.90.
15. Древалъ В.И. Изменение структуры липидного компонента плазматических мембран при экстракции периферических белков // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 63, № 1. - С. 91-94.
16. Древалъ В.И. Влияние ионов кальция на структуру плазматических мембран // Укр. биохим. журн. - Т. 63, № 1. - С. 104-107.
17. Древалъ В.И., Назаренко Н.Д. Связывание ионов кальция с плазматическими мембранами тимоцитов // Научные доклады высшей школы. Биол. науки. - 1991. - № 1. - С. 27-31.
18. Древалъ В.И., Назаренко Н.Д. Проницаемость плазматических мембран тимоцитов для ионов кальция // Научные доклады высшей школы. Биол. науки. - 1991. - № 2. - С. 157-160.
19. Древалъ В.И., Емец Б.Г. Влияние D_2O на Ca^{2+} -АТФазу плазматических мембран // Биофизика. - 1991. - Т. 36, № 2. - С. 374-376.
20. Древалъ В.И., Финашина А.В. Влияние ионов магния на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу плазматических мембран тимоцитов // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 63, № 5. - С. 106-109.
21. Древалъ В.И. Влияние кальция на перекисное окисление липидов в плазматических мембранах // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 63, № 5. - С. 109-112.
22. Древалъ В.И., Финашина А.В. Влияние перекисного окисления липидов плазматических мембран на активность Ca^{2+} -АТФазы // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 36, № 5. - С. 799-801.
23. Древалъ В.И. Изменение липидного и белкового компонентов плазматических мембран тимуса при перекисном окислении липидов // Биохимия. - 1991. - Т. 56, № 9. - С. 1613-1619.
24. Древалъ В.И. Влияние АТФ на структуру плазматических мембран // Биофизика. - 1991. - Т. 36, № 6. - С. 1000-1003.
25. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. Исследование пространственной организации белок-липидных комплексов методом флуоресцентных зондов // Доп. ВИНТИ № 371-391 от 23.01.91.
26. Древалъ В.И. Влияние АТФ и ионизирующего излучения на структуру плазматических мембран // Биополимеры и клетка. - 1992. - Т. 8, № 1. - С. 78-82.
27. Древалъ В.И. Влияние ионизирующего излучения на активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы плазматических мембран // Радиобиология. - Т. 32, № 2. - С. 222-224.

28. Древалъ В.И. Порадіаційні зміни активності Ca^{2+} -АТФазы і Mg^{2+} -АТФазы плазматичних мембран тимоцитів // Укр. біохім. журн. - 1992. - Т. 64, № 5. - С. 103-106.
29. Древалъ В.И. Влияние ускоренных электронов на электрохимическую стабильность эритроцитов // Электронная обработка материалов. - 1992. - № 8. - С. 42-44.
30. Оболенцева Г.З., Ветров П.П., Товстяк В.З., Древалъ В.И., Гарная С.З., Брюзгинова Л.П. Вещество, обладающее радиопротекторными свойствами. Заявка на изобретение № 4950053/14, првор. 27.06.91. Решение о выдаче патента от 06.09.93.
31. Древалъ В.И. Пострадиационные изменения структуры липидов и белков плазматических мембран тимоцитов // Биополимеры и клетка. - 1993. - Т. 9, № 1. - С. 35-39.
32. Древалъ В.И. Влияние ионизирующего излучения на белок-липидные комплексы липосом // Биополимеры и клетка. - 1993. - Т. 9, № 3. - С. 45-48.
33. Древалъ В.И. Эффект D_2O при облучении Ca^{2+} -АТФазы // Биофизика. - 1993. - Т. 38, № 3. - С. 525-527.
34. Древалъ В.И. Влияние ионизирующего излучения и кальция на структуру плазматических мембран // Радиобиология. - 1993. - Т. 33, № 1. - С. 31-35.
35. Древалъ В.И. Изменение структуры плазматических мембран при облучении тимоцитов // Там же. 1993. - Т. 33, № 1. - С. 36-41.
36. Древалъ В.И. Пострадиационные изменения связывания Ca^{2+} с плазматическими мембранами тимоцитов // Там же. - 1993. - Т. 33, № 1. - С. 42-44.
37. Древалъ В.И. Изменение липидного компонента плазматических мембран тимоцитов при воздействии ионизирующего излучения // Там же. - 1993. - Т. 33, № 1. - С. 45-48.
38. Древалъ В.И. Влияние ускоренных электронов на транспорт кальция в тимоците // Электронная обработка материалов. - 1993. - № 1. - С. 60-62.
39. Древалъ В.И. Влияние ионизирующего излучения на АТФазные активности плазматических мембран тимоцитов // Укр. біохім. журн. - 1993. - Т. 65, № 2. - С. 99-102.
40. Древалъ В.И. Фотореактивация Ca^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы после воздействия ионизирующего излучения // Биофизика. - 1993. - Т. 38, № 5. - С. 890-892.
41. Древалъ В.И. Влияние фракционированного облучения крас на структуру плазматических мембран тимоцитов // Биополе-

меры в клетка. - 1993. - Т.9, № 6. - С. 74-77.

42. Древалъ В.И. Влияние плазмы крови облученных животных на активность Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран тимоцитов // Радиационная биология. Радиэкология. - 1994. - Т. 54, № 1. - С. 39-41.

43. Древалъ В.И. Влияние ионизирующего излучения на Mg^{2+} -связывающие белки плазматических мембран тимоцитов // Там же. - 1994. - Т. 34, № 1. - С. 42-44.

44. Древалъ В.И. Влияние многократного облучения крыс на активность Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФазы плазматических мембран тимоцитов // Там же. - 1994. - Т. 34, № 1. - С. 45-48.

Древалъ

Щдписано до друку 25.04.94г. формат 60x84,1/16, папір для
розмножувальних апаратів, друк офсетний, ротариянт ХОУС,
ЗАМ. 796. тир. 130 прим. 310002 м. Харків вул. Маршала
Бажанова 28.

157191

AB 30.082

AB 30.082