Національна академія наук України
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького

На правах рукопису

КОВАЛЕНКО ІРИНА ЄВГЕНІЇВНА

ТРАНСПОРТНА ФУНКЦІЯ МЕМБРАНИ ЩІТКОВОЇ КАЙМИ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПІСЛЯ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ

03.00.08 - радіобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1995

АВ33.626

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі біохімії Київського університету ім. Тараса Шевченка

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00754942 (V)

Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор **В.М.Войціцький**

Офіційні опоненти : доктор біологічних наук **О.М.Федоров**
доктор біологічних наук **Ю.В.Бездробний**

Провідна установа - Київський державний медичний університет ім. О.О.Богомольця

Захист відбудеться "____" _____ 1995 р. о _____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.83.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України (252022, Київ-22, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ІЕПОР НАН України.

Автореферат розісланий "_____" _____ 1995 р.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
канд. біол. наук Г.Й.Лавренчук

ДВ 33.626

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Широке використання джерел іонізуючого випромінення в промисловості, медицині, наукових дослідженнях, потенціальна небезпека виникнення ядерних аварій, які, як свідчать події на ЧАЕС, можуть набувати катастрофічних розмірів - все це вимагає розширення досліджень дії іонізуючої радіації як на організм в цілому, так і на окремі тканини, органи і клітини.

Структурні та функціональні зміни в тонкому кишечнику, одному з найбільш радіочутливих органів, після дії високих доз опромінення (більше 10 Гр) вивчені відносно добре [Монастырская, 1978; Паршков, 1980; Костеша, 1990; Quastler, 1965]. Разом з тим, потребують значно детальнішого дослідження механізми впливу більш низьких доз радіації.

Провідна роль у здійсненні основних функцій тонкого кишечника - травної і всмоктувальної - належить плазматичній мембрані епітеліальних клітин (ентероцитів), яка містить різноманітні транспортні системи і контролює надходження поживних речовин з порожнини кишечника в кров і лімфу. Початковою та швидкість-лімітуючою стадією трансмембранного перенесення речовин є їх транспорт через апікальну плазматичну мембрану, так звану щіткову кайму (ЩК) [Уголев, 1986; Морозов, 1988]. Завдяки багатостороннім регуляторним взаємозв'язкам з клітинним метаболізмом і виключною функціональною важливістю порушення властивостей мембрани ЩК після опромінення може набувати першочергового значення в радіаційному пошкодженні ентероцитів і тонкого кишечника взагалі [Рыскулова, 1986; Дворецкий, 1990; Konigs, 1982; Lang, 1991].

Оскільки через мембрану ЩК переносяться різноманітні іони і нутрієнти, вивчення транспорту іонів кальцію (універсальний ре-

гулятор клітинного метаболізму [Болдырев, 1985; Rasmussen, 1983]) та таких життєвонеобхідних метаболітів як амінокислоти надасть різнобічну характеристику променевого ураження транспортних властивостей цієї мембрани. Крім того, з'ясування механізмів порушення транспортної функції мембрани ЩК при дії доз, значно нижчих від тих, які викликають кишкову форму променевої хвороби, дозволяє встановити наслідки даного впливу на процеси всмоктування у тонкому кишечнику, а також сприяє поглибленню знань у виявленні радіаційної стійкості даного органу і організму в цілому.

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи було вивчення функціональної активності (особлива увага приділялася транспортним властивостям) мембрани щіткової кайми (ЩК) епітеліальних клітин тонкого кишечника щурів після дії одноразового тотального рідкоіонізуючого (рентгенівського) випромінювання в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр через 1 добу після опромінення.

Досягнення зазначеної мети передбачало вирішення наступних задач : 1. Визначити активність ферментів, характерних мембрані ЩК ентероцитів (Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФази, лужної фосфатази, γ-глутаміл-трансферази) через 1 добу після опромінення. 2. Вивчити процес транспорту іонів кальцію мембранними препаратами ЩК після дії іонізуючого випромінення. 3. Дослідити механізми транспорту нейтральних амінокислот - фенілаланіну та лейцину через дану мембрану при променевому впливі. 4. Оцінити основні параметри транспорту Ca^{2+} та даних амінокислот через мембрану ЩК тонкого кишечника через 14 діб після опромінення в дозі 1,0 Гр (час, за який відбувається повне оновлення клітин кишкового епітелію).

Наукова новизна та практична значимість роботи. Проведено порівняльний аналіз і з'ясовано основні механізми радіаційно-індукованих порушень транспорту кальцію та нейтральних амінокис-

лот через мембрану ЩК тонкого кишечника щурів після рентгенівського опромінення в дозах 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 Гр.

Встановлено, що через 1 добу відбувається різке пригнічення Ca^{2+}-АТФазної активності, яке посилюється зі збільшенням дози опромінення. Активність лужної фосфатази, γ-глутамілтрансферази, а також Mg^{2+}-АТФази мембрани ЩК практично не змінюється при всіх дозах опромінення.

Показано, що радіаційно-індуковане збільшення Ca^{2+}-зв'язуючої здатності мембрани ЩК за рахунок підвищення кількості Ca^{2+}-зв'язуючих ділянок на зовнішній та внутрішній поверхні цієї мембрани може обумовлювати зростання Ca^{2+}-транспортуючої функції. Виявлено підвищення швидкості трансмембранного перенесення Ca^{2+} через мембрану ЩК після опромінення.

Вивчення різних шляхів транспорту амінокислот свідчить, що опромінення досліджуваними дозами викликає прискорення пасивної дифузії фенілаланіну та лейцину, а також пригнічення (особливо для лейцину) їх вторинно активного Na^{+}-залежного транспорту. Встановлено існування альтернативної специфічної для фенілаланіну Na^{+}-залежної системи транспорту, яка може відрізнятися за чутливістю до дії іонізуючої радіації.

Аналіз одержаних результатів дозволяє твердити, що основною причиною порушення транспортних властивостей є радіаційно-індуковане зростання проникливості мембрани ЩК.

Функціонування кальцій-транспортуючих систем, а також систем транспорту фенілаланіну та лейцину має здатність відновлюватися до контрольного рівня через 14 діб після опромінення.

Встановлені факти дають змогу з'ясувати особливості механізмів транспотру іонів кальцію та амінокислот через мембрану ЩК тонкого кишечника та їх можливі пострадіаційні порушення. Крім

того, вони можуть бути основою для розробки профілактичних мір і науково обгрунтованого добору лікувальних засобів при променевому ураженні тонкого кишечника.

Положення, що виносяться на захист. 1. Рентгенівське опромінення в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр через 1 добу викликає підвищення Ca^{2+}-транспортуючої функції мембрани ЩК тонкого кишечника за рахунок збільшення проникливості мембрани ЩК для даного іону, а також зростання Ca^{2+}-зв'язуючої здатності мембрани. 2. Променеве ураження в досліджуваних умовах викликає зростання пасивної дифузії амінокислот - фенілаланіну та лейцину через мембрану ЩК та пригнічення їх Na^{+}-залежного шляху транспорту. Причому вплив іонізуючої радіації на перший процес є більш вираженим. 3. Виявлені зміни транспорту Ca^{2+}, фенілаланіну та лейцину посилюються зі збільшенням дози опромінення, а через 14 діб після опромінення спостерігається майже повне відновлення цих транспортних процесів.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися на Радіобіологічному з'їзді (Київ, 1993), на 1 з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), на Міжнародному симпозіумі "Биологическая подвижность" (Москва, 1994), на наукових конференціях професорсько-викладацького складу Київського університету ім. Тараса Шевченка (Київ, 1994, 1995).

Впровадження. Матеріали дисертаційної роботи використовуються в курсах лекцій "Радіобіологія" та "Радіаційна екологія" Київського університету ім. Тараса Шевченка.

Об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури (3 розділи), матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення (4 розділів), заключення, висновків, переліку літератури (203 джерела). Робота викладена на 120 сторінках машинопису, містить 14 рисунків і 6 таблиць.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Дослідження проведені на щурах-самцях, вагою 180-200 г, яких одноразово тотально опромінювали в дозах 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 Гр на апараті РУМ-17 з тубусом при таких умовах : потужність дози в повітрі $2x10^{-4}$ А/кг, фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, сила струму 10 мА, напруга 200 кВ, шкірно-фокусна відстань 50 см.

Щурів декапітували через 1 добу після опромінення, оскільки в наших попередніх дослідженнях було встановлено односпрямований характер змін транспортної функції через 12 та 24 години після опромінення, і вони були більш вираженими через 24 години; крім того, функціонування дозрілих ентероцитів відбувається протягом короткого відрізку часу (20-24 години [Уголев, 1986]), а вже з 3-тьої доби після опромінення спостерігається відновлення транспортних властивостей мембрани ЩК [Baer, 1987].

Везикульовані мембранні препарати ЩК тонкого кишечника одержували згідно з методиками [Hopfer, 1973; Miller, 1981]. Вміст білку в об'єктах дослідження визначали за методом Лоурі і співав. [Lowry et al., 1951]. Чистоту препаратів ЩК, отриманих з контрольних і опромінених тварин оцінювали електронномікроскопічним методом [Lewis, 1977] та за активністю маркерних ферментів мембрани ЩК - лужної фосфатази [Ghijsen, 1980] і γ-глутамілтрансферази [Lin, 1981]. АТФазну активність визначали так, як вказується в роботі [Ghijsen, 1980].

Вивчення поглинання, виходу та зв'язування Ca^{2+} мембранними везикулами ЩК проводили радіоізотопним методом згідно [Miller, 1981; Miller, Tung, 1982] в розчині (об'єм 0,3 мл), який містив 10 мМ HEPES-трис (pH 7,5 при 25^0C), 100 мМ Д-сорбітол, 1 мМ $CaCl_2$ (при дослідженні зв'язування іона з мембраною концентрація Ca^{2+}

становила 0,1-4 мМ) та $^{45}CaCl_2$ з молярною радіоактивністю 0,3 мКі/ммоль. Реакцію ініціювали внесенням 0,05 мг білку в пробу.

Накопичення фенілаланіну та лейцину вивчалося з використанням α-(^{14}C)-фенілаланіну і α-(^{14}C)-лейцину (молярна радіоактивність 2,8 мКі/ммоль і 2,6 мКі/ммоль, відповідно) згідно [Satoh, 1989] в розчині (об'єм 0,5 мл), який містив 10 мМ HEPES-тріс (pH 7,5 при 25^0 С), 100 мМ Д-сорбітол, 0,1 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl або 100 мМ KCl, 0,1 мМ фенілаланін або 0,1 мМ лейцин. Реакцію ініціювали внесенням 0,05 мг білку в пробу. Дифузію амінокислот оцінювали за кількістю накопиченого міченого субстрату препаратами ЩК, які попередньо були навантажені немміченим фенілаланіном або лейцином.

Реакцію зупиняли шляхом швидкого фільтрування через мембранні фільтри. Радіоактивність препаратів визначали за допомогою рідинно-сцинтиляційного лічильника SL-4000 фірми "Intertechnique". Статистична обробка даних проводилась загальноприйнятими методами варіаційної статистики [Плохинский, 1980].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення функціонального стану мембрани ЩК тонкого кишечника щурів через 1 добу після рентгенівського опромінення в дозах 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 Гр показало, що активність маркерних ферментів цієї мембрани - лужної фосфатази та ɣ-глутамілтрансферази, а також Mg^{2+}-АТФази практично не змінюється при всіх дозах опромінення. Найбільш радіочутливою є Ca^{2+}-АТФаза, активність якої знижується в 1,7 разів при опроміненні дозою 0,5 Гр з подальшим різким її зменшенням при збільшенні дози опромінення. Але, грунтуючись на літературних даних, участь її в транспорті Ca^{2+} мембранами ЩК

остаточно не доведена [Ohta, 1989].

Кальцій-транспортуюча здатність мембрани ЩК ентероцитів після дії рентгенівського опромінення.

Одним з основних механізмів транспорту кальцію через мембрану ЩК є пасивне перенесення іону за електрохімічним градієнтом [Van Os, 1987]. Дослідження накопичення Ca^{2+} везикульованими мембранними препаратами ЩК свідчить, що в присутності 1 мМ ЕДТА в промиваючому розчині знижується кількість накопиченого Ca^{2+} як в контрольних, так і в препаратах, одержаних з опромінених тварин, хід кінетичних кривих при цьому не змінюється (рис.1 А, Б). Крім того, встановлено, що за даних умов (тобто в присутності ЕДТА) частково зменшується і різниця між рівнями накопичення Ca^{2+} в контрольних та опромінених препаратах. Отже, однією з можливих причин збільшення рівня накопичення Ca^{2+} після опромінення є додаткова сорбція іона на зовнішній поверхні мембрани ЩК.

При визначенні початкової швидкості накопичення Ca^{2+} виявлено зростання даного параметра з підвищенням дози опромінення в 1,2; 2,0; 2,8 і 2,9 разів при дії доз 0,5; 1,0; 2,0 і 3,0 Гр, відповідно, порівняно з контролем. Початкова швидкість накопичення Ca^{2+} в препаратах з опромінених тварин є вищою від контрольного рівня, незалежно від вмісту ЕДТА в промиваючому розчині. Це дозволяє стверджувати про зростання швидкості транспорту Ca^{2+} всередину везикул ЩК, а не тільки про його сорбцію назовні.

Доказом існування трансмембранного перенесення Ca^{2+} є стимуляція його накопичення та виходу в присутності кальцієвого іонофору А23187 (25 мкМ), що виявлено як в контрольних, так і одержаних з опромінених тварин препаратах.

Кінетичний аналіз процесу транспорту іонів кальцію свідчить про зростання максимальної швидкості (Vmax) накопичення Ca^{2+} в

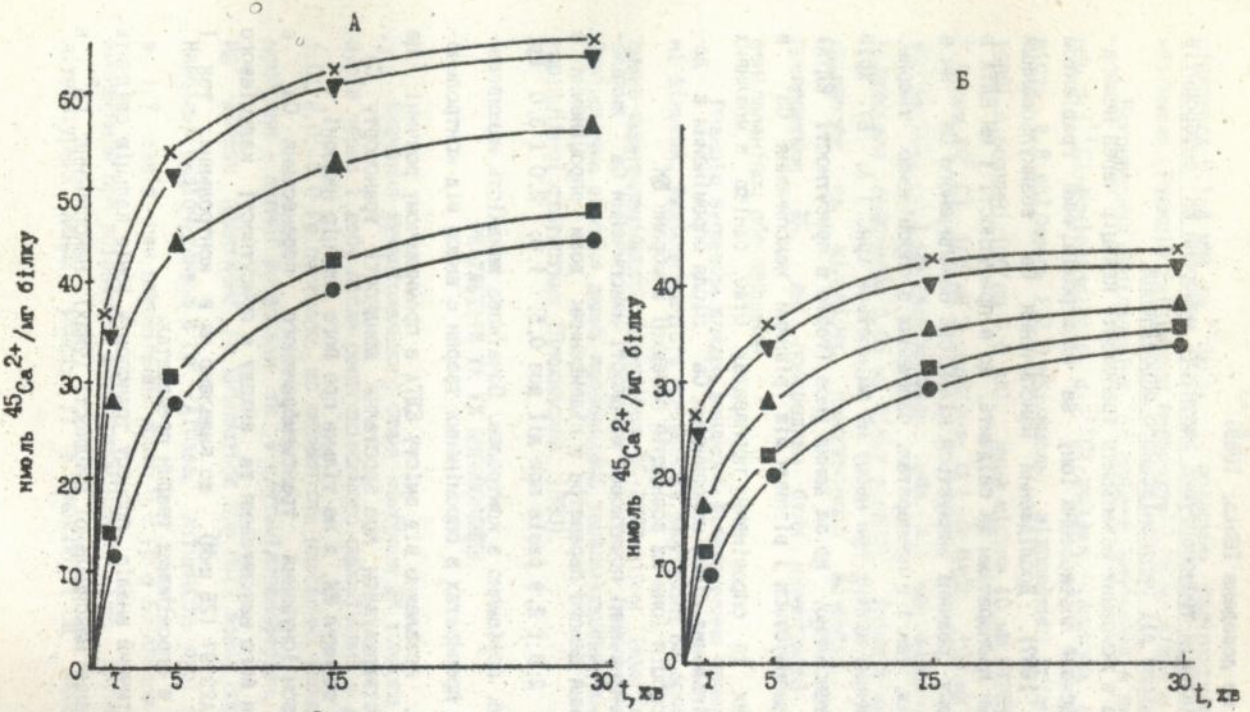

Рис. 1. Накопичення Ca^{2+} мембранними препаратами ЩК без /А/ або в присутності 1мМ ЕДТА /Б/ в промивному розчині в контролі /●/ і після опромінення в дозах 0,5 Гр /■/, 1,0 Гр /▲/, 2,0 Гр /▼/ та 3,0 Гр /×/.

1,6; 1,7; 2,0 і 2,2 рази при опроміненні в дозах 0,5; 1,0; 2,0 і 3,0 Гр, відповідно, порівняно з контролем (табл.1). При цьому спорідненість (Km) цієї транспортної системи до субстрату практично не змінюється.

Таблиця 1.

КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ ПАСИВНОГО ТРАНСПОРТУ Ca^{2+} МЕМБРАНАМИ ЩІТКОВОЇ КАЙМИ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

(M ± m, n=4-6)

Умови досліду	Параметри	
	Km, мМ	Vmax, нмоль/мгбілку·хв
Контроль	1,12 ± 0,06	24,8 ± 1,8
0,5 Гр	1,10 ± 0,05	40,2 ± 2,5*
1,0 Гр	1,02 ± 0,04	43,3 ± 2,3*
2,0 Гр	1,22 ± 0,05	53,5 ± 3,5*
3,0 Гр	1,24 ± 0,06	55,5 ± 3,8*
1,0 Гр через 14 діб	1,14 ± 0,05	33,5 ± 2,6*

* - $P < 0,05$ по відношенню до контролю

Пасивне накопичення Ca^{2+} везикульованими мембранами ЩК значною мірою визначається проникливістю мембрани для даного іона. В зв'язку з цим вивчали вихід Ca^{2+} з попередньо пасивно навантажених везикул ЩК в середовище, яке містить ЕГТА. За даних умов фаза вивільнення Ca^{2+} відображує проникливість везикул ЩК для кальцію. Встановлено, що зі збільшенням дози опромінення проникливість мембрани ЩК зростає. Одержані результати узгоджуються з відомою для плазматичних мембран інших клітин реакцією на дію іонізуючого випромінювання [Рыскулова, 1986; Дворецкий, 1990].

Отже, радіаційно-індуковане порушення транспорту Ca^{2+} проявляється в збільшенні швидкості трансмембранного перенесення іона внаслідок підвищення проникливості мембрани ЩК і, можливо, також виникнення як специфічних, так і неспецифічних шляхів транспорту кальцію [Braun, 1984; Van Os, 1987].

Відомо, що зв'язування Ca^{2+} є необхідною стадією трансмембранного і трансклітинного перенесення даного іона і, крім того, мембрані ЩК властива досить висока Ca^{2+}-зв'язуюча здатність [Miller, Tung, 1982]. Тому з метою більш детального визначення механізмів впливу іонізуючого випромінення на процес транспорту іонів кальцію через мембрану ЩК тонкого кишечника вивчалося пострадіаційне зв'язування Ca^{2+} з цією мембраною.

Дослідження зв'язування Ca^{2+} з мембранною поверхнею ЩК і аналіз одержаних результатів за методом Скетчарда свідчать, що в діапазоні концентрацій Ca^{2+} $1x10^{-4}$ - $4x10^{-3}$ мМ отримані з контрольних і опромінених тварин препарати ЩК характеризуються двома типами центрів зв'язування : Ca^{2+}-зв'язуючі ділянки 1 типу, уявна константа дисоціації ($K_д$) яких становить $2,3x10^{-4}$ М і вони володіють більш високою спорідненістю до Ca^{2+}, та ділянки 2 типу з $K_д=1,2x10^{-3}$ М (табл.2). Згідно з даними літератури [Miller, 1981]

уявна константа дисоціації для ділянок 2 типу відповідає величині $K_д$ для центрів низької спорідненості. Встановлено, що значення уявної константи дисоціації комплексу "Ca^{2+} - мембрана ЩК" практично не змінюється при всіх дозах опромінення, порівняно з контролем (табл. 2). В той же час вплив іонізуючої радіації викликає збільшення кількості центрів зв'язування Ca^{2+} (n) різних типів, що й спричиняє підвищення Ca^{2+}-зв'язуючої здатності мембрани ЩК. Як свідчать наведені в таблиці 2 результати, кількість ділянок 1 типу зростає приблизно в 2,0 рази незалежно від дози опромінення, а кількість ділянок 2 типу (низької спорідненості) різко підвищується зі збільшенням дози опромінення : від 1,3 разів при дозі 0,5 Гр до 2,4 разів при дозах 2,0 і 3,0 Гр.

Дослідження Ca^{2+}-транспортуючої і Ca^{2+}-зв'язуючої здатності мембрани ЩК через 14 діб після опромінення в дозі 1,0 Гр свідчить про часткове відновлення кінетичних параметрів транспорту іона (табл. 1), що взаємозв'язане зі зменшенням кількості Ca^{2+}-зв'язуючих ділянок низької спорідненості (табл. 2) до рівня контролю в цей період. Кількість ділянок 1 типу (більшої спорідненості) залишається на тому ж рівні, як і через 1 добу після опромінення.

Вважається [Miller, Tung 1982], що центри зв'язування Ca^{2+} низької спорідненості (головним чином фосфоліпіди) розміщені на зовнішній поверхні мембрани ЩК, а високої, які містять білки та фосфопротеїни, - на внутрішній її поверхні. Можна припустити, що одна з причин зростання транспорту кальцію через мембрану ЩК після опромінення пов'язана з відповідним зростанням Ca^{2+}-зв'язуючих ділянок на зовнішній поверхні мембрани. В той же час збільшення кількості внутрішньовезикулярних Ca^{2+}-зв'язуючих центрів, головним чином це ділянки 1 типу, перш за все обумовлює підвищення Ca^{2+}-зв'язуючої ємності мембрани ЩК.

Таблиця 2.

ХАРАКТЕРИСТИКИ Ca^{2+}-ЗВ'ЯЗУЮЧИХ ДІЛЯНОК МЕМБРАННИХ ПРЕПАРАТІВ ЩІТКОВОЇ КАЙМИ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА (M±m, n=4-6)

Умови досліду	Параметри			
	1 тип		2 тип	
	Kd ($x10^{-4}$M)	n, нмольCa^{2+}/мг білку	Kd ($x10^{-3}$M)	n, нмольCa^{2+}/мг білку
Контроль	2,3 ± 0,07	16,0 ± 1,4	1,2 ± 0,05	46,0 ± 3,5
0,5 Гр	2,2 ± 0,06	26,1 ± 1,8*	1,1 ± 0,03	57,1 ± 4,3*
1,0 Гр	1,8 ± 0,05	38,2 ± 2,5*	1,4 ± 0,05	103,0 ± 7,5*
2,0 Гр	2,0 ± 0,06	30,0 ± 2,6*	1,4 ± 0,06	110,4 ± 7,8*
3,0 Гр	2,1 ± 0,05	29,6 ± 2,4*	1,4 ± 0,05	108,5 ± 7,3*
1,0 Гр через 14 діб	2,4 ± 0,06	27,0 ± 2,0*	1,0 ± 0,04	70,2 ± 6,5*

* - P < 0,05 по відношенню до контролю

Дослідження накопичення Ca^{2+} в присутності інгібіторів - кадмію (1 мМ) і лантану (0,5 мМ) - контрольними препаратами ЩК і після опромінення також дозволяє охарактеризувати зміни Ca^{2+}-зв'язуючої здатності мембрани ЩК. Як відомо, La^{3+} витісняє мембранозв'язаний Ca^{2+}, не транспортуючись через мембрану [Squier, 1990], а Cd^{2+} конкурує за Ca^{2+}-зв'язуючі ділянки як на зовнішній, так і на внутрішній мембранній поверхні [Verbost, 1987]. Підсилення інгібуючого ефекту лантану від 15 % до 30%, а також зниження рівню кальцієвого накопичення при інгібуванні кадмієм в 1,5-2,0 рази з підвищенням дози опромінення свідчить, що променеве ураження викликає збільшення доступності Ca^{2+}-зв'язуючих ділянок як на внутрішній, так і на зовнішній поверхні мембрани ЩК.

Таким чином, різнобічні дослідження механізмів пострадіаційного порушення процесу транспорту Ca^{2+} через мембрану ЩК дозволяють стверджувати, що при дії іонізуючого випромінення в дозах 0,5-3,0 Гр збільшується рівень і швидкість накопичення Ca^{2+} везикульованими мембранами ЩК. Причиною даних змін є, з одного боку, збільшення проникливості мембрани, а з другого - зростання кількості Ca^{2+}-зв'язуючих ділянок, перш за все, внаслідок підвищення їх доступності на зовнішній та внутрішній мембранній поверхні.

Виявлені радіаційно-індуковані пошкодження можуть призводити до зміни внутрішньоклітинної концентрації іону, а отже і до порушення Ca^{2+}-гомеостазу.

Вплив іонізуючого опромінення на механізми транспорту амінокислот через мембрану ЩК ентероцитів.

Згідно з даними літератури [Stevens, 1982; Satoh, 1989] в мембрані ЩК тонкого кишечника існує декілька шляхів транспорту

нейтральних амінокислот - Na^+-залежний, Na^+-незалежний та пасивна дифузія, які й було досліджено.

Встановлено, що опромінення в дозах 0,5; 1,0; 2,0 і 3,0 Гр викликає підвищення пасивної дифузії фенілаланіну та лейцину в середньому в 4,5-5,0 разів, порівняно з контролем (рис.2). Причому, на відміну від лейцину, для якого зі збільшенням дози опромінення характерно подальше підвищення дифузійного процесу, для фенілаланіну зростання дози опромінення веде до незначного зниження цього процесу (рис.2). Необхідно підкреслити, що збільшення пасивної дифузії даних амінокислот після опромінення є більш вираженим в початковий момент часу (30 сек інкубації), ніж в стані рівноваги, що вказує на зростання саме швидкості їх пасивного накопичення.

Дослідження Na^+-незалежного шляху транспорту амінокислот (в присутності K^+-градієнта, зверненого ззовні всередину везикул ЩК) свідчить, що його внесок у процес трансмембранного перенесення фенілаланіну та лейцину є незначним і він майже не змінюється при дії іонізуючої радіації в дозах 0,5-3,0 Гр.

Na^+-залежний шлях транспорту амінокислот через мембрану ЩК визначали як різницю накопичення в середовищі з NaCl і KCl. Присутність Na^+-градієнта, зверненого ззовні всередину везикул ЩК, стимулює накопичення як фенілаланіну, так і лейцину. Спостерігається так званий ефект "овершуту", тобто значне підвищення швидкості накопичення в початковий момент часу, що також вказує на трансмембранне перенесення даних амінокислот (рис.3). Виявлено, що іонізуюче випромінення в досліджуваних дозах викликає пригнічення вторинно активного Na^+-залежного транспорту обох амінокислот.

Аналіз кінетичних параметрів дозволяє твердити, що дане по-

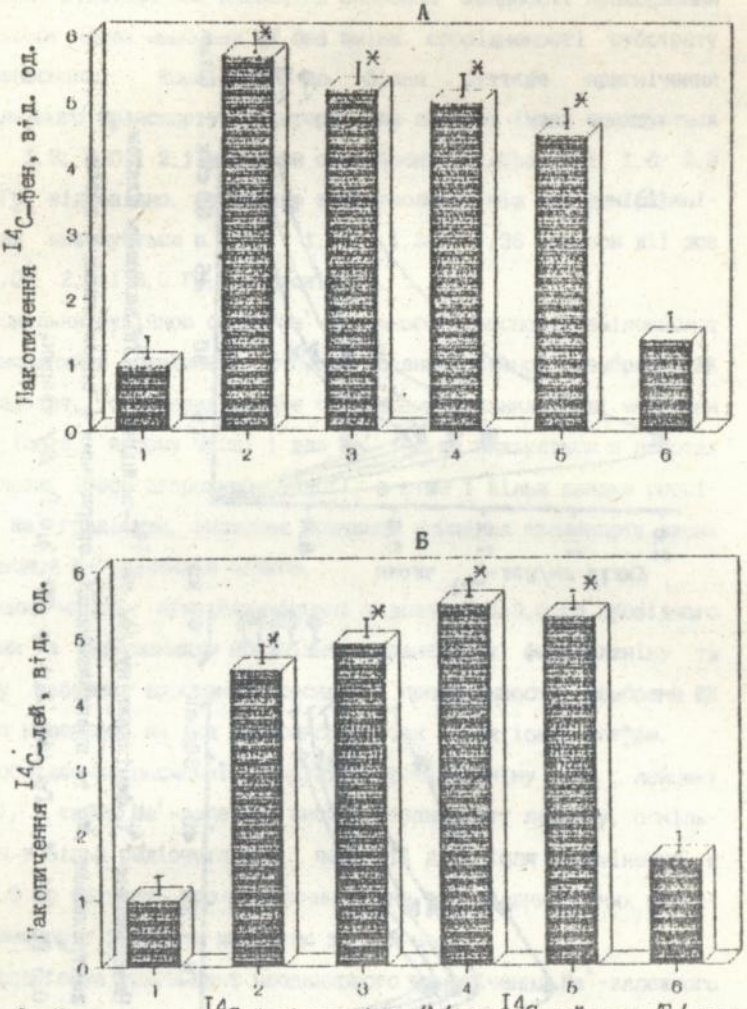

Рис.2. Накопичення ^{14}С-фенілаланіну /А/ та ^{14}С-лейцину /Б/ шляхом пасивної дифузії препаратами ЦК за 30 секунд інкубації в контролі /1/, через 1 добу після опромінення в дозах 0,5 Гр /2/, 1,0 Гр /3/, 2,0 Гр /4/, 3,0 Гр /5/, а також через 14 діб після опромінення дозою 1,0 Гр /6/.
* - $P < 0,05$

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

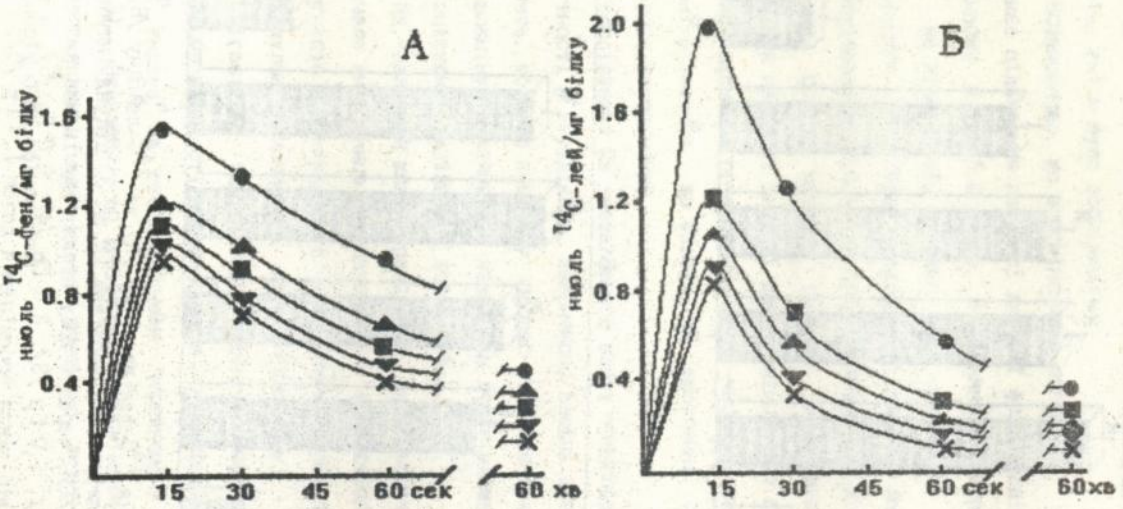

Рис.3. Накопичення ^{14}С-фенілаланіну /А/ та ^{14}С-лейцину /Б/ Na⁺-залежним шляхом контрольними /●/ та препаратами ЩК, одержаними з опромінених в дозах 0,5 Гр /■/, 1,0 Гр /▲/, 2,0 Гр /▼/, 3,0 Гр /×/ тварин.

порушення відбувається внаслідок зниження швидкості проходження амінокислот через мембрану ЩК без зміни спорідненості субстрату до переносника. Показано, що більш суттєве пригнічення Na^+-залежного транспорту характерно для лейцину (Vmax зменшується в 1,7; 1,8; 2,0 і 2,1 рази при опроміненні в дозах 0,5; 1,0; 2,0 і 3,0 Гр, відповідно, порівняно з контролем), ніж для фенілаланіну (Vmax зменшується в 1,25; 1,20; 1,35 і 1,36 раз при дії доз 0,5; 1,0; 2,0 і 3,0 Гр, відповідно).

Оскільки рушійною силою Na^+-залежного транспорту амінокислот є сформований з зовнішньої сторони везикульованої мембрани ЩК Na^+-градієнт, то пострадіаційне збільшення проникливості мембрани ЩК для іонів, в тому числі і для Na^+ (на що вказується в роботах [Рыскулова, 1986; Дворецкий, 1990]), а отже і більш швидке розсіювання Na^+-градієнта, виступає причиною зниження транспорту даних амінокислот Na^+-залежним шляхом.

Таким чином, при опроміненні в дозах 0,5-3,0 Гр провідного значення в порушеннях механізмів транспорту фенілаланіну та лейцину набуває зростання пасивної проникливості мембрани ЩК тонкого кишечника як для амінокислот, так і для іонів натрію.

Дослідження пасивної дифузії фенілаланіну та лейцину (рис.2), а також Na^+-залежної системи транспорту лейцину, оскільки вона є більш радіочутливою, через 14 діб після опромінення в дозі 1,0 Гр свідчить про практично повне відновлення даних процесів транспорту до рівня контролю за цей час.

Заслуговує уваги факт неоднакового пригнічення Na^+-залежного транспорту фенілаланіну та лейцину після опромінення. Пояснення цьому полягає в тому, що, на відміну від лейцину, який транспортується лише шляхом спільним для всіх нейтральних амінокислот, для фенілаланіну відома ще одна Na^+-залежна система

транспорту [Stevens, 1982; Kudo, 1987; Satoh, 1989]. Отже, менш значне пострадіаційне пригнічення Na^+-залежного транспорту фенілаланіну свідчить, що альтернативна специфічна для фенілаланіну Na^+-залежна система транспорту може відрізнятися за чутливістю до дії іонізуючої радіації.

Таким чином, радіаційне ураження в дозах 0,5-3,0 Гр через 1 добу після опромінення викликає порушення процесів транспорту Ca^{2+}, фенілаланіну та лейцину через мембрану ЩК тонкого кишечника, які посилюються зі збільшенням дози. Основною причиною пошкодження транспортних властивостей мембрани ЩК після променевого впливу в досліджуваних дозах є зростання проникливості цієї мембрани як для іонів так і для амінокислот. Виявлене підвищення Ca^{2+}-зв'язуючої здатності мембрани ЩК відбувається лише за рахунок збільшення кількості Ca^{2+}-зв'язуючих ділянок на мембрані. В той же час спорідненість Ca^{2+} та амінокислот до їх переносників залишається незмінною після опромінення.

Крім того, встановлено, що через 14 діб (після опромінення дозою 1,0 Гр) відбувається майже повне відновлення транспортної функції мембран ЩК.

Отже, виявлені порушення, мабуть, в першу чергу обумовлені конформаційними змінами білкових та ліпідних компонентів мембрани ЩК, порушеннями білок-ліпідних та ліпід-ліпідних взаємодій, а також змінами в ліпідному складі мембрани. Суттєве пошкодження мембранозв'язаних переносників за даних умов опромінення навряд чи відбувається.

ВИСНОВКИ

1. Тотальне рентгенівське опромінення безпорідних щурів-самців в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр через 1 добу викликає зростання швидкості транспорту іонів кальцію через мембрану щіткової кайми тонкого кишечника внаслідок збільшення проникливості мембрани для даного іону та підвищення кількості Ca^{2+}-зв'язуючих ділянок на мембрані. Результатом цього може бути порушення внутрішньоклітинного Ca^{2+}-гомеостазу.

2. За даних умов опромінення збільшується пасивна дифузія фенілаланіну та лейцину через мембрану щіткової кайми, а також пригнічується їх транспорт Na^{+}-залежним шляхом. Вплив іонізуючої радіації на перший процес є більш вираженим.

3. Na^{+}-залежна система транспорту фенілаланіну, порівняно з лейцином, є менш радіочутливою, що вказує на існування в мембрані щіткової кайми тонкого кишечника щурів специфічних до дії рентгенівського опромінення систем трансмембранного перенесення нейтральних амінокислот.

4. Іонізуюче випромінювання в дозах 0,5-3,0 Гр через 1 добу викликає зменшення активності Ca^{2+}-АТФази мембрани щіткової кайми, в той час як активності Mg^{2+}-АТФази, лужної фосфатази та γ-глутамілтрансферази практично не змінюються.

5. Функціонування кальцій-транспортуючих систем, а також систем транспорту фенілаланіну та лейцину має здатність відновлюватися до контрольного рівня через 14 діб після опромінення.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Степанов Ю.В., Векслярский Р.З., Степанова Л.И., Коваленко И.Е., Кучеренко Н.Е. Функциональное состояние ферментов тонкого кишечника при длительном воздействии малых доз ионизирующей радиации // Тез.докл. Радиобиол. съезда, Киев, 20-25 сент., Пущино, 1993.- Т.3.- С.957.

2. Хижняк С.В., Коваленко І.Є., Войціцький В.М., Кучеренко М.Є. Проникливість мембран щіткової кайми тонкого кишечника щурів для іонів кальцію після впливу рентгенівського випромінення // Доп. НАН України.- 1994.- N 7.- С.146-148.

3. Коваленко І.Є., Хижняк С.В., Степанов Ю.В., Войціцький В.М., Кучеренко М.Є. Вплив рентгенівського опромінення на транспорт іонів кальцію мембранами епітеліальних клітин тонкого кишечника // Тези доп. 1 з'їзду Українського біофізичного товариства, Київ 20-24 черв. 1994, Київ, 1994.- С.48.

4. Коваленко І.Є. Вивчення транспортної функції мембран щіткової кайми тонкого кишечника після впливу малих доз рентгенівського випромінення // Збірник праць студентів та аспірантів Київ. ун-ту, Київ 1994. С.87-96.

5. Хижняк С.В., Коваленко І.Є., Ващенко І.В., Войціцький В.М. Вплив іонізуючої радіації на транспортні властивості мембрани щіткової кайми тонкого кишечника // Укр. біохім. журн.- 1995.- Т.67, N 4.- С.53-56.

6. Hizhnyak S.V., Kovalenko I.E., Stepanov Y.V., Vashenko I.V., Voitsitsky V.M. Changes of calcium fluxes in small intestine induced by ionizing radiation // Abstr. Inter. Symp. "Biological mobility", Moscow, 1994. P.135.

Kovalenko I.E. Transport function of brush-border membrane of small intestinal epithelial cells after irradiation exposure (manuscript).

The dissertation work for the degree of candidate of biological sciences (speciality 03.00.08 - radiobiology). Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of Ukrainian NAS, Kiev, 1995.

6 scientific works are defending, they have include data about effect of ionizing irradiation in doses 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 Gr on transport of calcium ions and neutral amino acid - phenylalanine and leucine by rats small intestinal brush-border membrane, and also on the enzymes activity of alkaline phosphatase, ɣ-glutamyltranspherase and Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase in these membrane.

Коваленко И.Е. Транспортная функция мембраны щеточной каймы эпителиальных клеток тонкого кишечника после воздействия ионизирующей радиации (рукопись).

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.08 - радиобиология. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается 6 научных работ, в которых содержатся данные о воздействии ионизирующей радиации в дозах 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 Гр на транспорт ионов кальция и нейтральных аминокислот - фенилаланина и лейцина, а также на активности щелочной фосфатазы, ɣ-глутамилтрансферазы и Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазы мембраны щеточной каймы тонкого кишечника крыс.

Ключові слова: мембрана щіткової кайми, ентероцити, тонкий кишечник, кальцій, фенілаланін, лейцин, іонізуюче опромінення, дози.

452963

Ав 33.626