

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ
І РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р. Є. КАВЕЦЬКОГО**

На правах рукопису

НАГНИБЕДЮК ВАСИЛЬ ВАСИЛЬОВИЧ

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН ТОНКОЇ КИШКИ
ПІСЛЯ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ**

03.00.08-радіобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ — 1996

ДВ 33.726

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі біохімії Київського університету імені Тараса Шевченка.

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

Офіційні опоненти: доктор медичних наук,
професор **Є. Ю. Чеботарьов**

доктор біологічних наук,
професор **П. В. Усатюк**

Провідна установа — Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України

Захист відбудеться «20» серпня 1996 р. о 14 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).

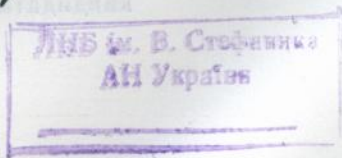
З дисертацією можна ознайомитися в бібліотечі ІЕПОР НАН України.

Автореферат розісланий «20» серпня 1996 р.

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00753799 (/)



Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
канд. біол. наук

Г. Й. ЛАВРЕНЧУК

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи: Постійно зростаюче використання джерел іонізуючої радіації в господарській діяльності робить все більш актуальною задачу з'ясування механізмів її вражаючої дії. Особлива увага зараз приділяється цьому питанню в зв'язку з аварією на ЧАЕС. Певну зацікавленість має розгляд закономірностей впливу опромінення на клітинному рівні. Саме тут формується основа порушень, які пізніше проявляються у вигляді різноманітних радіаційних синдромів. При розгляді властивостей клітин в організмі, який піддається впливові іонізуючого випромінювання, більш суттєвою може стати не стільки зміна певних параметрів функціонування клітини, скільки виявлення взаємозв'язку порушень, що при цьому спостерігаються.

У відношенні епітеліальних клітин тонкої кишки, яка є одним з найбільш радіочутливих органів організму, на даний час накопичено досить багато даних літератури, присвячених різносторонньому вивченню кишкової форми ураження [Костеша Н.Я., 1990, Паршков. Е.М., 1980]. Однак відомостей про взаємозв'язок змін ультраструктури різних клітин епітелію з іншими (зокрема біохімічними) показниками при дії сублетальних доз опромінення недостатньо.

Основна функція тонкої кишки - розщеплення та транспорт поживних речовин - в значній мірі визначається високоспеціалізованою структурою пулу епітеліальних клітин - ентероцитів. В регуляції трансклітинного перенесення різноманітних метаболітів та іонів суттєву роль відіграє функціонування систем транспорту іонів, зокрема кальцію, оскільки він відіграє провідну роль у пошкодженні клітин [Хансон К.П., 1985].

Виявлення основних порушень клітин та відповідна їх реакція

на дію різних доз іонізуючого опромінення сприяє вирішенню одного з найважливіших питань радіобіології - з'ясування механізмів пошкоджуючого впливу радіації на організм.

Мета і завдання дослідження: Метою даної роботи було вивчення впливу одноразового тотального рідкоіонізуючого (рентгенівського) випромінювання в сублетальних дозах на ультраструктурну організацію епітелію тонкої кишки шурів та функціональну активність ентероцитів. Досягнення зазначеної мети передбачає вирішення наступних завдань: 1. Виявити особливості ультраструктури клітин епітелію тонкої кишки шурів через 1 добу після рентгенівського опромінення в дозах 0.5, 1.0, 2.0 та 3.0 Гр. 2. Оцінити проліферативну активність епітеліальних клітин тонкої кишки при променевому ураженні в даних умовах. 3. Дослідити вплив рентгенівського опромінення на поверхневий заряд та проникність плазматичної мембрани ентероцитів. 4. З'ясувати особливості транспорту кальцію та лейцину ентероцитами тонкої кишки після дії іонізуючого випромінювання.

Наукова новизна та практична значимість роботи. Проведено різнобічний аналіз структурно-функціонального стану тонкої кишки шурів через 1 добу після рентгенівського опромінення в дозах 0.5, 1.0, 2.0 та 3.0 Гр.

Показано, що в залежності від дози опромінення спостерігаються деструктивні зміни тонкої кишки: спустошення крипт, вкорочення ворсинок, зменшення кількості епітеліальних клітин і, можливо, як результат цього - збільшення проліферативної активності стовбурових клітин. Серед клітин епітелію (ентероцитів, бокаловидних, клітин Панета та ін.) виявлена різна ступінь променевого ураження, найбільш радіочутливі з них - ентероцити.

Встановлено в результаті опромінення збільшення від'ємного

заряду цитоплазматичної мембрани клітин, що може призводити до зміни функціонального стану клітин.

Показано, що досліджувані дози іонізуючої радіації впливають на транспортну здатність ентероцитів. Основною причиною порушення клітинного Ca^{2+} -гомеостазу є дозозалежне підвищення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} як в результаті порушень в перерозподілі іону у внутрішньоклітинних пулах, так і, мабуть в більшій мірі, за рахунок збільшення проникливості мембрани для цього іону.

Встановлений факт зростання проникності апікальної мембрани ентероцитів для ряду іонів є основною причиною пригнічення вторинного активного накопичення клітинами L-лейцину, поряд із збільшенням процесу накопичення цієї амінокислоти Na^+ -незалежним шляхом.

Виявлені структурно-функціональні порушення епітелію тонкої кишки на різних рівнях його організації при дії іонізуючого випромінювання розширюють уявлення про початкові механізми виникнення кишкової форми променевої хвороби. Дані про взаємозв'язок зміни будови та функції кишки (зокрема епітеліальних клітин) в результаті опромінення можуть бути основою для розробки профілактичних мір і науково обгрунтованого добору лікувальних засобів при променевому ураженні тонкої кишки.

Положення, що виносяться на захист. 1. Рентгенівське опромінення в дозах 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 Гр через 1 добу призводить до порушення структури слизової оболонки тонкої кишки. Із збільшенням дози зростає ступінь ураженості і розширюється спектр типів клітин, які вражаються (ентероцити, бокаловидні клітини, клітини Панета та строми). 2. Сублетальні дози іонізуючого випромінювання призводять до зміни транспортної функції епітеліальних клітин,

про що свідчать порушення їх Ca^{2+} -гомеостазу та механізмів накопичення ними L-лейцину (Na^+ -залежного та Na^+ -незалежного). З.Вплив іонізуючої радіації за даних умов проявляється на всіх рівнях організації тонкої кишки (мембранному, клітинному та тканинному), причому тільки опромінення в дозах 1.0 Гр та більше призводить до достовірно зареєстрованих різнобічних змін.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися на 1-му з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), Радіобіологічному з'їзді (Дніпропетровськ, 1995), 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 (2 розділи), матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення (4 розділи), заключення, висновків, переліку літератури (244 джерела). Робота викладена на 145 сторінках машинопису, містить 37 рисунків і 4 таблиці.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Дослідження проведені на щурах-самцях (вагою 180-220 г.), яких одноразово тотально опромінювали в дозах 0.5, 1.0, 2.0 та 3.0 Гр на апараті РУМ-17 в тубусом при наступних умовах: потужність дози в повітрі 2×10^{-4} А/кг, фільтри 0.5 мм Cu та 1 мм Al , сила струму 10 мА, напруга 200 кВ, шкірофокусна відстань - 50 см.

Тварин декапітували через 1 добу після опромінення. Цей термін вибрано по декількох причинах. По-перше, за цей час не відбу-

взяться ще повного оновлення ентероцитів тонкої кишки [Морогов И.А., 1988]. По-друге, згідно з даними [Бродский Р.А., 1987] більш виражений вплив іонізуючої радіації на функціонування тонкокишкового епітелію проявляється саме через 1 добу, оскільки вже через 3 доби при дії доз менше 10.0 Гр спостерігається відновлення структурно-функціональних властивостей.

Для вивчення морфологічних показників готували парафінові зрізи, які забарвлювали гематоксилином Вемера та еозином. Для отримання напівтонких зрізів об'єкти заливали в епон. Вимір поперечного перерізу ядер ентероцитів проводили на установці "Інтеграл-2МТ" за програмою "Маркер".

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили на ультратонких зрізах, які виготовляли на ультрамікротомі ЛКВ 8800 III (Швеція) і контрастували ураніацетатом та цитратом свинцю [Reynolds E.S., 1963]. Препарати досліджували на електронному мікроскопі JEM 100 В (Японія).

Виділення епітеліальних клітин тонкої кишки проводили згідно з рекомендаціями, наведеними в роботах [Watford, 1979, Усатюк П.В., 1990, 1994] з невеликими модифікаціями. Везикульовані препарати апікальної мембрани ентероцитів (ділянка плазматичної мембрани, повернута в порожнину кишечника) отримували згідно з методиками [Norfer U., 1973, Miller A., 1981]. Вміст білку в об'єктах дослідження визначали за методом Лоурі із співавт. [Lowry O.H. et al., 1951], а кількість клітин в пробі - забарвлюючи трипановим синім згідно [Evans E.M., 1971], використовуючи камеру Горяєва.

Реєстрацію мембранного потенціалу проводили, використовуючи метод синтетичних проникаючих іонів [Топалы В.П. и др., 1969]. Поверхню активність ентероцитів досліджували на межі розподілу

фаза "вода-повітря", визначаючи поверхневий тиск згідно [Langmuir I., 1971] та граничний стрибок потенціалу [Богуславский Л.І., 1978].

Концентрацію Ca^{2+} в ентероцитах визначали за допомогою флуоресцентного зонду INDO-1/AM [Grynkiwicz G., 1984]. Енергозалежне накопичення Ca^{2+} суспензією ентероцитів тонкої кишки досліджували радіоізотопним методом з використанням принципу аплікації аразків на фільтрах згідно [Velasco B., 1986] в розчині (об'ємом 0.5 мл), який містив 20 мМ HEPES-Tris (pH 7.4), 150 мМ KCl, 5 мМ MgSO_4 , 5 мМ АТФ (або без), 3 мМ сукцинат натрію (або без), 2 мМ фосфат калію, 0.01 мМ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (молярна радіоактивність 0.3 мКі/ммоль), дигітонін - 0.1 мг/мл.

Накопичення L-лейцину ентероцитами тонкої кишки визначали радіоізотопним методом, згідно [Satoh D., 1989]. Розчин інкубації (об'єм 0.5 мл) містив: 10 мМ HEPES-Tris (pH 7.5 при 25°C), 100 мМ Д-сорбітол, 0.1 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl (або 100 мМ KCl), 0.1 мМ ^{14}C -лейцин (молярна радіоактивність 2.6 мКі/ммоль).

При вивченні накопичення ентероцитами Ca^{2+} і L-лейцину реакцію ініціювали внесенням 0.05 мл суспензії, яка містила $(2-5) \times 10^6$ клітин, а зупиняли - шляхом швидкого фільтрування через мембранні фільтри. Радіоактивність препаратів вимірювали на рідинносцинтиляційному лічильнику SL-4000 фірми "Intertechnique" (Франція).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

1. Структурно-функціональний стан слизової оболонки тонкої кишки після впливу іонізуючої радіації.

В результаті морфологічних досліджень епітелію тонкої кишки після опромінення в дозах 0.5-3.0 Гр встановлено, що в ранній пострадіаційний період (1 доба) зменшується висота ворсинок (на 10-15%) та їх кількість на 1 мм довжини кишки (на 25-28%) без суттєвої різниці в дозах опромінення (табл.1). Зменшення розмірів

Таблиця 1.

МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ (M±m, n=3-4)

Умови дослідю	Висота ворсинок (мкм)	Кількість ворсинок (на 1 мм довжини)	Площа перерізу ядер епітеліоцитів (мкм ²)	Висота епітеліоцитів (мкм)
Контроль	893.6±22.3	7.2±0.4	33.5±0.6	37.1±0.7
Опромінення:				
0.5 Гр	875.6±35.5	5.2±0.2*	24.6±0.5*	37.3±0.6
1.0 Гр	824.8±24.4*	5.8±0.4*	23.7±0.6*	36.6±0.6
2.0 Гр	680.0±32.5*	5.7±0.3*	24.8±1.1*	32.2±0.8*
3.0 Гр	653.2±16.1*	5.6±0.2*	27.2±0.9*	29.9±1.7*
1.0 Гр через 14 діб	826.4±42.1	5.9±0.2*	33.4±0.7	32.2±1.1*

* P<0.05 відносно контролю

ентероцитів більш виражене тільки при опроміненні дозами 2.0 і 3.0 Гр (пересічно на 20%). Площа перерізу ядер ентоероцитів зменшується на 24-26% при дії всіх доз, що може свідчити про зниження синтезуючої активності клітин.

В результаті проведення ультраструктурних досліджень було встановлено, що загальною тенденцією розвитку патологічного процесу в слизовій оболонці тонкої кишки щурів із збільшенням дози опромінення від 0.5 до 3.0 Гр можна вважати наростання інтенсивності і поширеності некротичних явищ в епітелії і строми.

Так, через 1 добу після опромінення в дозі 0.5 Гр реєструються зони незначної деструкції в епітелії, очагове ураження строми та її набряк. Гинуть поодинокі стромальні клітини (в основному це лімфоцити).

Опромінення в дозі 1.0 Гр призводить до розширення очагових дистрофічних і, рідше, некробіотичних змін ультраструктури клітинних елементів епітелію (особливо диференційованих) і строми (особливо її імункомпетентних клітин).

При дії іонізуючої радіації в дозі 2.0 Гр спостерігається наростання проявів дистрофії і внутрішньоклітинного некробіозу цитоплазми (головним чином циліндричних клітин епітелію). Однак, очаги їх некрозу рідкі і локалізовані. Новим феноменом при цій дозі опромінення є різка дистрофія клітин Панета та ентерохромафінних клітин з невеликою зернистістю.

При опроміненні в дозі 3.0 Гр спостерігається збільшення частоти виникнення некрозу як цілих клітин епітелію і строми, так і ультраструктурних компонентів, які їх утворюють. В епітелії з'являються великі поля (зони) некрозу у вигляді повного лізису групи клітин. Місцями відбувається зональне відшарування лізованого матеріалу аж до базальної мембрани (виразки).

Вивчення різних ділянок тонкої кишки показало достовірне зниження популяції клітин крипт, які утворюють її проліферативну зону (табл.2), на фоні зростання їх проліферативної активності (рис.1). Слід зазначити, що особливо висока проліферативна активність стовбурових клітин тонкої кишки спостерігалась при опроміненні в дозі 1.0 Гр і вона залишалась підвищеною навіть через 14 діб після опромінення. Одночасно при опроміненні в дозах 2.0 та 3.0 Гр менш суттєва зміна мітотичної активності в порівнянні з контролем супроводжується пошкодженнями як деяких недиференційованих клітин, розміщених в криптальній зоні, так і різних захисних

Таблиця 2

ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОСТІ КРИПТ ТОНКОЇ КИШКИ КОНТРОЛЬНИХ ТА
ОПРОМІНЕНИХ ЩУРІВ (M±m, n=5)

Умови досліді	Відділи тонкої кишки		
	Початок	Середина	Кінець
Контроль	30.2±0.5	36.1±0.6	32.0±0.1
Опромінення			
0.5 Гр	27.7±0.7*	32.2±1.1*	33.8±1.1*
1.0 Гр	24.2±1.1*	22.9±1.2*	20.3±1.0*
2.0 Гр	18.1±1.3*	20.5±1.3*	20.3±1.4*
3.0 Гр	25.6±1.2*	29.9±1.0*	26.2±1.3*
1.0 Гр че- рез 14 діб	21.8±1.1*	28.8±1.3*	33.0±1.2

* P<0.05 відносно контролю

Мітотичний індекс, від. од.

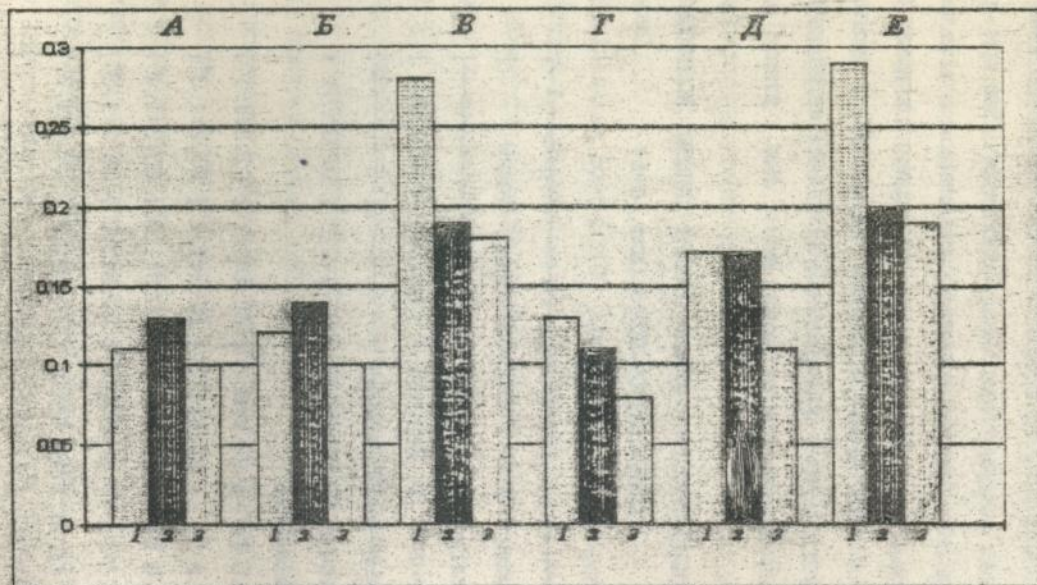


Рис. 1. Мітотична активність стовбкових клітин крипт тонкої кишки щурів в контролі (А), через 1 добу після опромінення в дозі 0.5 Гр (В), 1.0 Гр (В), 2.0 Гр (Г), 3.0 Гр (Д) та через 14 днів після опромінення в дозі 1.0 Гр (Е). 1-початок тонкої кишки, 2-середня ділянка, 3-кінцева.

структур (зокрема імунокомпетентних) та бокаловидних клітин.

Таким чином, аналіз результатів морфологічних досліджень свідчить про рівноманітність деструктивних процесів в слизовій оболонці тонкої кишки, зокрема ступеня ураженості епітеліальних клітин в залежності від дози і їх типу.

2. Поверхнева активність епітеліальних клітин тонкої кишки.

Вивчення поверхневої активності епітеліальних клітин тонкої кишки в модельній системі "вода-повітря" свідчить про те, що введені у водну субфазу ентероцити мають поверхневу активність, вони сорбуються на межу розподілу фаз. Виділені в опромінених тварин клітини збільшують граничний стрибок потенціалу пересічно на 7%, 14%, 22% та 25% відповідно при опроміненні в дозах 0.5, 1.0, 2.0 та 3.0 Гр, що вказує на збільшення від'ємного поверхневого заряду. В свою чергу це свідчить про структурні зміни клітинної мембрани під впливом іонізуючого випромінювання. Крім того ентероцити, виділені в опромінених тварин, формують на межі розподілу водної та повітряної фаз моношари з меншим поверхневим натягом. Так, при опроміненні у вище вказаних дозах поверхневий тиск зменшувався пересічно на 9%, 12%, 18% та 19% відповідно.

Виявлені зміни поверхневої активності ентероцитів, викликані іонізуючою радіацією, можуть призвести до порушення взаємодії цих клітин між собою та іншими клітинами, що відобразиться на їх функціональній активності.

3. Вивчення проникливості апікальної мембрани ентероцитів для іонів натрію, калію та кальцію.

Іонну проникливість апікальної мембрани ентероцитів оцінювали по величині дифузного мембранного потенціалу, який виникав при розсіюванні штучно створених градієнтів іонів Na^+ , K^+ та Ca^{2+} , методом синтетичних проникаючих іонів, використовуючи аніон фенілдикарбаундекаборан (ФКБ^-). За 100% в контролі приймали максимальну величину зміни концентрації ФКБ^- , зумовлену 100-кратним градієнтом K^+ . Тоді для Na^+ ця величина складає близько 66%, а для Ca^{2+} - 20%, (враховували, що електричний заряд Ca^{2+} дорівнює +2).

При вивченні проникливої здатності апікальної мембрани ентероцитів, отриманих через 1 добу після опромінення тварин в дозах 0.5, 1.0, 2.0 та 3.0 Гр, було встановлено, що розсіювання 100-кратного градієнта K^+ викликає підвищення, порівняно з контролем, дифузного мембранного потенціалу, відповідно в 1.5, 2.5, 2.7 та 2.9 разів. Відповідно для Na^+ - в 1.4, 1.8, 2.1 та 2.3 разів, а для Ca^{2+} - в 1.4, 1.8, 2.0 та 2.2 разів (табл.3).

Таким чином, при дії іонізуючої радіації в досліджуваних дозах збільшується проникливість апікальної мембрани ентероцитів для Na^+ , K^+ та Ca^{2+} . Слід зазначити, що для K^+ і дещо в меншій мірі для Na^+ цей ефект більш виражений, ніж для Ca^{2+} . Крім того він підсилюється із збільшенням дози.

ПРОНИКЛИВА ЗДАТНІСТЬ АПІКАЛЬНОЇ МЕМБРАНИ ЕНТЕРОЦИТІВ ДЛЯ K^+ ,
 Na^+ ТА Ca^{2+} ($M \pm m$, $n=3$)

Іон	Проникливість, %				
	Контроль	Дози опромінення, Гр			
		0.5	1.0	2.0	3.0
K^+	100	150±10*	250±12*	270±14*	290±11*
Na^+	66±5	94±5*	121±5*	142±8*	154±10*
Ca^{2+}	20±4	28±3	36±3*	40±3*	44±5*

* - $P < 0.05$ по відношенню до контролю

4. Транспортні властивості епітеліальних клітин
тонкої кишки після впливу іонізуючої
радіації.

Визначення концентрації цитозольного Ca^{2+} в ентероцитах тонкої кишки показало, що в контролі ця величина становила 108 ± 12 нМ, а після опромінення в дозах 0.5, 1.0, 2.0 та 3.0 Гр зростала пересічно на 14%, 32%, 62% та 63% відповідно. Оскільки в підтримці внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу приймають участь не тільки транспортні системи, пов'язані з плазматичної мембраною, але й внутрішньоклітинні органели, було оцінено вплив радіації на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} внутрішньоклітинними структурами. Для

цього суспензію епітеліальних клітин обробляли розчином дигітоніну, в результаті чого збільшувалась доступність компонентів середовища інкубації до Ca^{2+} -вміщуючих внутрішньоклітинних структур.

Результати свідчать про активне накопичення Ca^{2+} внутрішньоклітинними структурами як контрольними препаратами, так і отриманими в опромінених тварин (рис.2). Причому збільшення АТФ-залежної акумуляції Ca^{2+} в середовищі з сукцинатом натрію і її зниження в присутності азиду натрію (5 мМ) свідчать про участь мітохондріальної системи акумуляції Ca^{2+} . В свою чергу підвищення кількості активно накопиченого Ca^{2+} в середовищі без сукцинату натрію вказує на наявність немітохондріального пулу (ендоплазматичний ретикулум) Ca^{2+} .

Іонізуюча радіація призводить до зниження АТФ-залежного накопичення Ca^{2+} внутрішньоклітинними структурами, причому більш суттєвий ефект спостерігається із збільшенням дози опромінення до 2.0 та 3.0 Гр.

Таким чином, отримані дані свідчать, що радіаційне ураження ентероцитів призводить до збільшення вмісту цитозольного кальцію. Це викликано, мабуть, підвищенням в результаті опромінення, проникливості плазматичної мембрани, поряд із зниженою акумуляцією даного іону внутрішньоклітинними структурами.

Результати по накопиченню L-лейцину ентероцитами тонкої кишки в контрольних та опромінених тварин свідчать, що в присутності Na^+ -градієнту кінетика накопичення амінокислоти у всіх вивчених препаратах характеризується наявністю ефекту "овершуту". Максимальний рівень накопичення L-лейцину клітинами в контрольних та опромінених тварин досягається через 15 сек інкубації, а через 60 хв наставав стан рівноваги. Отримані дані вказують на те, що із збільшенням дози опромінення зменшується швидкість накопичення

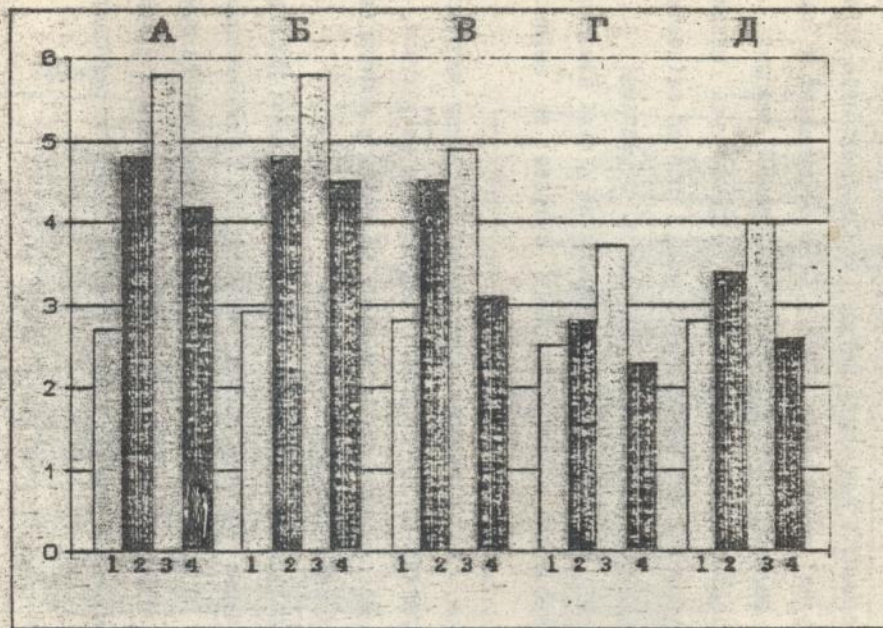


Рис. 2. Накопичення іонів кальцію в оброблених дигітоніном ентероцитах тонкої кишки з контрольних (А) та опромінених тварин в дозах 0.5-Гр (Б), 1.0 Гр (В), 2.0 Гр (Г) та 3.0 Гр (Д) за 5 хв інкубації. Середовище інкубації без АТФ і сукцинату натрію (1), без сукцинату натрію в присутності АТФ (2), з усіма дозавками (3) і з ацетом натрію (4).

Д-р М. В. Стефанюк
ДНУ України

L-лейцину в присутності іонів натрію (рис.3,а).

Ефект "овершуту" зумовлений наявністю електрохімічного градієнту іонів натрію між зовнішнім та внутрішнім середовищем клітини. Він швидко розсіюється як завдяки здійсненню Na^+ /субстратного антипортеру, так і за рахунок зміни проникливості плазматичної мембрани ентероцитів для іонів натрію. Оскільки остання збільшується в результаті опромінення, то це може бути однією з причин аменшення Na^+ -залежного накопичення ентероцитами L-лейцину.

При дії іонізуючого випромінювання підвищується швидкість надходження субстрату Na^+ -незалежним шляхом, про що свідчать результати дослідження накопичення L-лейцину в середовищі з KCl. Слід відмітити, що за даних умов загальний рівень накопичення L-лейцину ентероцитами в стані рівноваги, суттєво не змінюється (рис.3,б).

Таким чином, Na^+ -незалежне надходження L-лейцину зростає одночасно з пригніченням Na^+ -залежного надходження за рахунок, можливо, підвищеної проникності апікальної мембрани в пострадіаційний період для даної амінокислоти та Na^+ .

Отримані результати морфологічних та біохімічних досліджень свідчать, що через 1 добу після дії іонізуючого випромінювання в дозах 0.5-3.0 Гр проявляються різносторонні структурні та функціональні зміни клітин тонкої кишки, які поглиблюються з підвищенням дози опромінення. Найбільш радіочутливі серед епітеліоцитів є ентероцити.

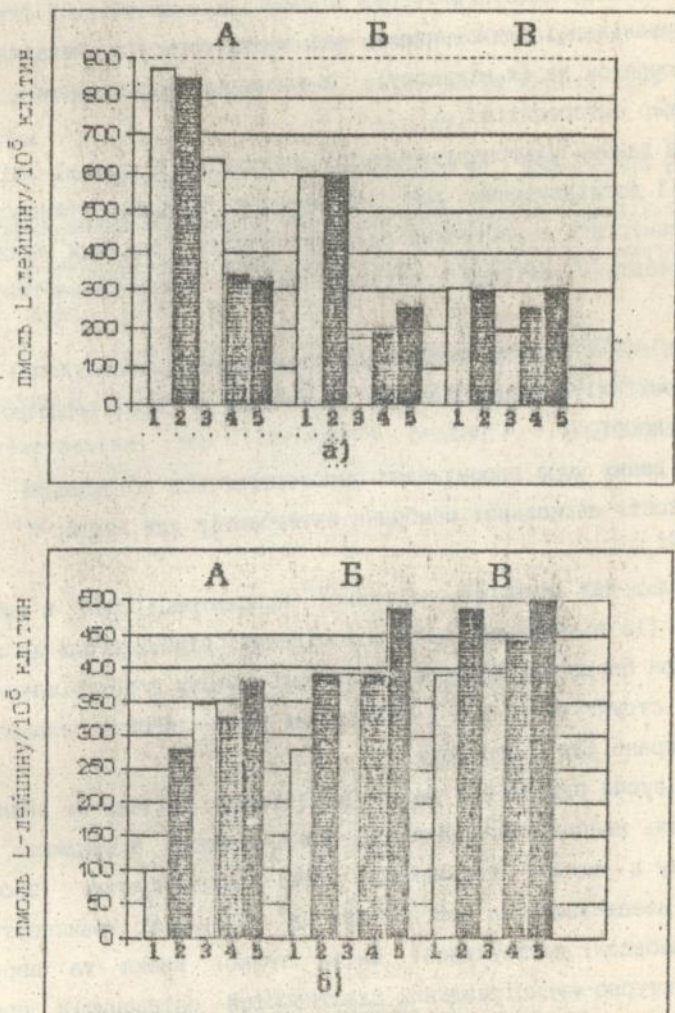


Рис. 3. Накопичення L-лейцину ентероцитами тонкої кишки в контролі (1) та через 1 добу після опромінення в дозі 0.5 Гр (2), 1.0 Гр (3), 2.0 Гр (4) та 3.0 Гр (5) через 15 сек (А), 30 хв (Б) та 60 хв (В) інкубації в середовищі а NaCl (а) та KCl (б).

ВИСНОВКИ

1. Одноразове тотальне рентгенівське опромінення в дозах 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 Гр через 1 добу викликає зміни в структурній організації тонкої кишки, які проявляються в зменшенні висоти ворсинок та їх кількості, а також площі поперечного перерізу ядер ентероцитів.
2. За даними ультраструктурного аналізу епітеліальні клітини при дії досліджуваних доз опромінення по радіочутливості можна розмістити в наступний ряд: ентероцити > клітини строми > бокаловидні клітини > клітини Панета > enteroхромафінні клітини.
3. Іонізуюче випромінювання викликає зменшення популяції стовбурових клітин крипт на фоні зростання їх проліферативної активності.
4. За даних умов опромінення спостерігається збільшення проникливості апікальної мембрани ентероцитів для іонів: K^+ > Na^+ > Ca^{2+} .
5. Збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} в ентероцитах (із підвищенням дози опромінення) відбувається як за рахунок порушення перерозподілу його вмісту у внутрішньоклітинних структурах, так і збільшення проникливості плазматичної мембрани для цього іону.
6. Іонізуюча радіація в умовах дослідження суттєво не впливає на рівень накопиченого ентероцитами L-лейцину, а викликає тільки зміну в шляхах надходження цієї амінокислоти: зростання Na^+ -незалежного та пригнічення Na^+ -залежного транспорту.
7. Встановлені деструктивні зміни тонкої кишки та порушення структурно-функціональних властивостей ентероцитів при дії сублетальних доз іонізуючої радіації можна розглядати як початкові механізми променевого ураження.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Степанов Ю.В., Мельничук І.В., Нагнибедюк В.В., Гаврилей В.І.
Всмоктування глюкози та лейцину в тонкому кишечнику після хронічного впливу рентгенівського проміння // І-й в'їзд українського біофізичного товариства, Київ, 20-24 червня 1994 р.: Матеріали в'їзду:- Київ, 1994.- С. 223-224.
2. Ващенко І.В., Хижняк С.В., Нагнибедюк В.В., Войціцький В.М.
Структурні зміни апікальної мембрани ентероцитів в результаті впливу рентгенівського випромінювання // Український радіологічний журн.- 1996.- №1.-С.11-15.
3. Хижняк С.В., Коваленко І.Є., Нагнибедюк В.В., Ващенко І.В., Войціцький В.М. Транспорт Ca^{2+} в ентероцитах тонкої кишки при дії сублетальних доз іонізуючої радіації.- Київ:Либідь, 1996.- 44 с.

Nagnybedyuk V.V. Morpho-functional characterization of small intestine epithelial cells after ionizing radiation exposure (manuscript)

The thesis for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences (speciality 03.00.08-radiobiology). Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of Ukrainian NAS, Kiev, 1996.

The results of 3 scientific publications are defended. They include data on the effect of ionizing radiation in doses of 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 Gy on structural state of small intestine epithelial cells, their proliferating activity and enterocytes transport properties.

Нагнибедюк В.В. Морфофункціональна характеристика епітеліальних кліток тонкої кишки после воздействия іонізуючої радіації (рукопись)

Дисертація 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, 1996.

Защищается 3 научных работы, в которых содержатся данные о воздействии ионизирующей радиации в дозах 0.5, 1.0, 2.0 и 3.0 Гр на структурное состояние эпителиальных клеток тонкого кишечника, их пролиферативную активность и транспортные свойства энтероцитов.

Ключові слова: тонка кишка, ентероцити, ультраструктура, іони, лейцин, проникливість, іонізуюче випромінювання, сублетальні дози.

Підписано до друку 12.05. 1996 р. Друк офсетний. Тираж 100 екз.
Зам. 05594. Безкоштовно. ДП «Артемполіграф»

436893

AB 35126

AB 35.126