

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ,  
ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ  
імені Р.Є. КАВЕЦЬКОГО

*На правах рукопису*

ВАЩЕНКО ІРИНА ВОЛОДИМИРІВНА

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЛАЗМАТИЧНОЇ  
МЕМБРАНИ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА  
ПІСЛЯ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ**

03.00.08 - радіобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1997



Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі біохімії біологічного факультету Київського університету імені Тараса Шевченка.

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

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук Ю.В. Бездробний  
доктор біологічних наук В.А. Тугай

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

Захист відбудеться "19" липеня 1997р. о 12 годині  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.83.01 в Інституті  
експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН  
України (252022 м. Київ-22, вул. Васильківська,45)

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту  
експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН  
України

Автореферат розісланий "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1997р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

Г.Й. Лавренчук

ДВ 37.846

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність роботи. Важливе значення в механізмі дії іонізуючого опромінення відводиться структурним змінам клітинної поверхні, і серед них порушенням ліпідних, вуглеводних і білкових компонентів плазматичних мембран опромінених клітин.

Провідна роль в здійсненні основних функцій тонкого кишечника, який є одним з радіочутливих органів, належить плазматичній мембрані клітин кишкового епітелію, а саме ентероцитів. Складовими частинами плазматичної мембрани ентероциту є апікальна (АМ) (повернена в порожнину кишечника) та базолатеральна (БМ) мембрани, які містять різноманітні транспортні системи і контролюють трансклітинне і трансмембранне перенесення іонів та поживних речовин з порожнини тонкої кишки в кров і лімфу [Уголев, 1986; Морозов, 1988].

Недостатність комплексних даних щодо післярадіаційних фізичних і хімічних змін плазматичної мембрани клітин тонкої кишки не дозволяє оцінити роль мембранної структури в формуванні наслідків дії радіації, в тому числі в дозах, значно нижчих від тих, що викликають кишкову форму променевої хвороби.

З'ясування особливостей порушення топографії АМ та БМ ентероцитів після впливу іонізуючої радіації може сприяти більш глибокому вивченню механізмів післярадіаційного порушення функціональних систем плазматичної мембрани ентероцитів тонкої кишки.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було вивчення структурного стану плазматичної мембрани ентероцитів (а саме її апікальної та базолатеральної складових частин) тонкого кишечника шурів після дії одноразового тотального рентгенівського опромінення в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр через 1 добу після опромінення. Досягнення зазначеної мети передбачає вирішення наступних завдань: 1. Оцінити структурний стан поверхневого шару АМ та БМ ентероцитів тонкого кишечника шурів після одноразового рентгенівського опромінення в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр. 2. Вивчити в цих умовах мікрор'язкість ліпідної компоненти плазматичної мембрани ентероцитів тонкого кишечника шурів. 3. Визначити конформаційні зміни білкових молекул

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

АМ та БМ в результаті впливу досліджуваних доз іонізуючої радіації. 4. Дослідити просторову організацію білково-ліпідних комплексів плазматичної мембрани еритроцитів. 5. Оцінити можливість взаємозв'язку радіаційноіндукованих змін структурного стану плазматичної мембрани еритроцитів та її  $\text{Ca}^{2+}$ - транспортуючої здатності.

#### Наукова новизна та практична значимість роботи.

В даній роботі вперше проведено систематичні дослідження основних структурних змін апікальної та базолатеральної складових частин плазматичної мембрани еритроцитів при дії іонізуючої радіації в дозах від 0,5 до 3,0 Гр.

За допомогою флуоресцентного зонду АНС встановлено зміни поверхневого шару плазматичної мембрани, про що свідчать зміни спектральних характеристик та параметрів зв'язування даного зонду з мембраною, а також більш від'ємний поверхневий потенціал мембранних препаратів, отриманих із опромінених тварин.

Використання різних гасників флуоресценції триптофану дозволило оцінити конформаційний стан і внутрішню молекулярну просторову перебудову білків АМ, які містять триптофанілі різної локалізації та виявити переміщення поверхневих білків в глибину ліпідної фази після дії іонізуючої радіації.

За допомогою методу індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) виявлені порушення просторової організації білково-ліпідних комплексів в результаті опромінення (переміщення центру білкової маси мембран у напрямку від границі позподілу фаз ліпід/вода) та зменшення товщини плазматичної мембрани, що вказує на можливість утворення агрегатів білкових молекул.

Відмічено підвищення мікрів'язкості ангулярних ліпідів у порівнянні з рештою ліпідної маси в препаратах АМ та БМ. Показано, що опромінення викликає зменшення мікрів'язкості ангулярних ліпідів АМ та БМ, в той час як для бішарових ліпідів цей показник майже не змінюється. Вперше за допомогою методу ІРПЕ було вивчено структурний стан плазматичної мембрани еритроцитів тонкої кишки в контрольних препаратах та після дії іонізуючої радіації. Проведено порівняльну характеристику окремих складових частин плазматичної мембрани еритроцитів (АМ та БМ). Спостерігались більш виражені структурні зміни АМ у порівнянні з БМ після дії досліджуваних доз іонізуючої радіації.

Виявлені післярадіаційні порушення транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  АМ та БМ, які полягають в збільшенні проникності цих мембран для  $\text{Ca}^{2+}$ ,

підвищення  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючої здатності АМ, пригнічення АТФ-залежного накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  БМ обумовлюють підвищення внутрішньоклітинної концентрації даного іону.

Одержані результати розширюють існуючі уявлення про первинні механізми дії іонізуючої радіації в діапазоні доз від 0,5 до 3,0 Гр на структурно-функціональні властивості тонкого кишечника. Вони можуть бути передумовою для науково обґрунтованого пошуку лікарських препаратів та розробки засобів зменшення негативного впливу іонізуючої радіації на структурно-функціональні властивості тонкого кишечника.

Положення, що виносяться на захист. 1.Рентгенівське опромінення в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр приводить до змін структурного стану апікальної та базолатеральної складових частин плазматичної мембрани еритроцитів, а саме їх поверхневих ділянок та області жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів. 2.В результаті впливу іонізуючої радіації виявлено зміни фізичних властивостей плазматичної мембрани еритроцитів: конформаційна модифікація мембранних білків, зменшення мікрів'язкості ангулярних ліпідів, а також зміни просторової організації білково-ліпідних комплексів. 3.Виявлені порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортуючої здатності АМ та БМ еритроцитів в результаті опромінення в дозах 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 Гр пов'язані з радіаційно-індукованими структурними перебудовами плазматичної мембрани. 4.Спостережені ефекти дії іонізуючої радіації підсилюються із збільшенням дози опромінення від 0,5 до 3,0 Гр.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи доповідались 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, 1994-1996), Міжнародному симпозиумі "Biological mobility" (Москва 1994).

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

Об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури (3 розділи), матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення (5 розділів), заключення, висновків, переліку використаної літератури (172 джерела). Робота викладена на 122 сторінках машинопису, містить 23 рисунки 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 з тубусом при наступних умовах: потужність дози в повітрі  $2 \times 10^{-4}$  А/кг, фільтри 0,5мм Cu, 1мм Al, сила струму 10мА, напруга 200 кВ, шкірофокусна відстань - 50 см.

Тварин декапітували через 1 добу після опромінення. Цей термін вибрано з декількох причин. По-перше, повне оновлення еритроцитів тонкої кишки відбувається через 3-6 діб [Морозов, 1988]. По-друге, більш виражений вплив іонізуючої радіації на функціонування тонкокишкового епітелію проявляється саме через 1 добу [Степанов, 1993; Хижняк, 1995], оскільки вже через 3 доби при дії доз менше 10 Гр спостерігається відновлення структурно - функціональних властивостей [Бродский, 1987].

Отримання суспензії епітеліальних клітин тонкої кишки проводили згідно з рекомендаціями наведеними в роботах [Watford, 1979; Усатюк, 1990, 1994] з деякими модифікаціями. Везикульовані препарати АМ та БМ еритроцитів отримували згідно методик [Hopfer, 1973; Miller, 1981]. Чистоту отримуваних препаратів плазматичної мембрани оцінювали за активністю маркерних ферментів даних мембран: АМ - за активністю лужної фосфатази та  $\gamma$ -глутамінтрансферази згідно [Ghijssen, 1980], БМ -  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -АТФази [Ghijssen, 1982], а також методом електронномікроскопічного аналізу в умовах негативного контрастування [Lewis, 1977]. Вміст білку в об'єктах дослідження визначали за методом [Lowry et al., 1951], а кількість клітин в пробі - забарвлюючи трипановим синім, згідно [Evans, 1971], використовуючи камеру Горяєва.

При вивченні структурного стану АМ та БМ еритроцитів тонкої кишки використовували від'ємно заряджений флуоресцентний зонд АНС. Параметри зв'язування зонду з мембранами розраховували за методом [Владимиров, Добрецов, 1980, ]. Дослідження мікрор'язкості АМ та БМ еритроцитів проводили з використанням флуоресцентного зонду пірену згідно з [Литвинов, 1982, Окунь, 1986]. Просторове взаємовідношення між білками та ліпідами в плазматичній мембрані оцінювали методом ІРПЕ [Добрецов, 1981, Фоменко, 1985] з донора (триптофанові залишки мембраних білків) на акцептор (пірен). При вивченні гасіння флуоресценції білків АМ використовували гасники різних класів: гідрофільний (акриламід) та гідрофобний ( $\text{MgCl}_2$ ). Визначення кількості місць та константи зв'язування іонів кальцію з плазматичною мембраною еритроцитів проводили з використанням  $\text{Ca}^{2+}$  - чутливого флуоресцентного зонду хлортетрацикліну згідно з [Добрецов, 1989].

Концентрацію цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в ентероцитах визначали за допомогою флуоресцентного зонду INDO-1/AM [Grinkiewicz, 1984]. Вивчення накопичення  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  везикульованими препаратами АМ проводили радіоізотопним методом згідно [Miller, 1981, Miller, Tung, 1982] в розчині (об'єм 0,3 мл), який містив 10мМ HEPES-Трис (рН 7,5 при 25°C), 100мМ D-сорбітол, 1мМ  $^{45}\text{CaCl}_2$  (0,3 мкКи/мл). Накопичення  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  препаратами БМ ентероцитів визначали згідно [Ghijsen, 1982] у розчині (об'ємом 0,5 мл), який містив 20мМ HEPES-Трис (рН 7,4), 100мМ  $\text{MgCl}_2$ , , 0,01 мМ  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (0,15 мкКи/мл) з (або без) 3мМ АТФ Реакцію ініціювали внесенням 0,05 мг білку в пробу, а зупиняли шляхом швидкого фільтрування через мембранні фільтри. Радіоактивність препаратів визначали за допомогою рідинно-сцинтиляційного лічильника SL-4000 фірми "Intertechnique" (Франція). Статистична обробка даних проводилась загальноприйнятими методами варіаційної статистики [Плохинский, 1980].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

### *1. Оцінка структурного стану плазматичної мембрани ентероцитів після опромінення.*

В дослідах з флуоресцентним зондом АНС встановлені порушення поверхневої структури плазматичної мембрани ентероцитів, про що свідчать виявлені зміни спектральних характеристик цього зонду та параметрів його зв'язування з апікальною та базолатеральною частинами цієї мембрани.

Зменшення флуоресценції АНС, зв'язаного з АМ та БМ ентероцитів із опромінених тварин приблизно на 5%, 8%, 18% і 25% відповідно при опроміненні в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр, напевно, обумовлено зниженням квантового виходу флуоресценції, який зменшувався приблизно на 9%, 14%, 19% та 27% відповідно при опроміненні у вказаних дозах в препаратах як АМ так і БМ.

Аналіз результатів свідчить, що при опроміненні спостерігається різнонаправленість в характері змін константи та кількості місць зв'язування зонду АНС з мембранами. Із збільшенням дози опромінення константа зв'язування зменшується на 9%, 15%, 59% та 80% відповідно при опроміненні в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр.

Таблиця 1. Вплив іонізуючого опромінення на спектральні характеристики та параметри зв'язування флуоресцентного зонду АНС в дослідях з апікальною (АМ) та базолатеральною (БМ) мембранами ентероцитів тонкої кишки ( $M \pm m$ ,  $n=4-5$ ).

Умови досліджу		Показник				
		Інтенсивність флуоресценції АНС, відн.од.	Квантовий вихід флуоресценції (Q), відн.од.	Зміна поверхневого потенціалу, $\Delta \varphi$ , мВ	Константа зв'язування, (K <sub>АНС</sub> ), мкМ <sup>-1</sup>	Кількість місць зв'язування, (N <sub>АНС</sub> ), нмоль/мг білку
Контроль	АМ	1,00	1,00	0	5,81±0,14	8,31±0,12
	БМ	1,00	1,00	0	5,01±0,11	7,02±0,11
Доза опромінення, Гр						
0,5	АМ	0,95±0,05	0,91±0,02	2,71±0,02	5,28±0,12	9,12±0,16*
	БМ	0,88±0,01*	0,84±0,04*	2,58±0,04	4,89±0,09	10,07±0,21*
1,0	АМ	0,92±0,03	0,86±0,06	3,63±0,03*	4,93±0,16	9,82±0,08*
	БМ	0,83±0,02*	0,79±0,03*	3,42±0,03*	4,51±0,13*	12,26±0,11*
2,0	АМ	0,82±0,04*	0,81±0,02*	3,78±0,04*	2,38±0,08*	12,67±0,13*
	БМ	0,79±0,06*	0,76±0,02*	3,71±0,02*	3,97±0,17*	14,89±0,25*
3,0	АМ	0,75±0,03*	0,73±0,01*	3,68±0,03*	1,19±0,16*	13,42±0,22*
1,0 через 14 діб	АМ	0,98±0,02*	0,89±0,02*	2,38±0,04	5,84±0,15	8,37±0,16

\* -  $p < 0,05$  по відношенню до контролю.

Примітка:  $\Delta \varphi = \varphi_a - \varphi_k$ , де  $\varphi_k$  - поверхневий потенціал мембран в контрольних препаратах,  
а  $\varphi_a$  - в препаратах після опромінення.

Поряд з цим, кількість місць зв'язування зростає відповідно на 9%; 18%; 52% та 61 % у порівнянні з контролем (табл.1).

В препаратах БМ спостерігались якісно аналогічні результати. При збільшенні дози опромінення до 2 Гр в два рази збільшувалась кількість місць зв'язування зонду з мембранами. Відмічено зменшення константи зв'язування приблизно на 10% та 21% відповідно при опроміненні у дозах 1,0 та 2,0 Гр (табл.1).

Виявлена різнонаправленість впливу опромінення на число місць зв'язування та константу зв'язування зонду АНС з мембраною, очевидно, свідчить про наявність такої модифікації структури мембрани, яка може визначатись змінами як ліпідної компоненти в області полярних "голівків" та гліцеринових залишків фосфоліпідів, так і мембранних білків. Напевно, конформаційні зміни білкових та ліпідних компонентів мембрани призводять до появи додаткових ділянок зв'язування АНС, враховуючи, що флуоресценція змішаного бішару складним чином залежить від його складу.

Оскільки АНС несе одиничний від'ємний заряд, то логічно припустити, що дані зміни залежать від поверхневого потенціалу мембрани. Зміна поверхневого потенціалу ( $\Delta\phi$ ) незалежно від дози опромінення складає 3,5 - 3,8 мВ в порівнянні з контролем, і вказує на більш від'ємний потенціал як АМ так і БМ, виділених із опромінених тварин.

Слід відмітити, що на 14 добу після опромінення в дозі 1 Гр спектральні характеристики зонду АНС та параметри його зв'язування з мембранами практично не відрізнялись від контролю. Це вказує на тимчасовий характер структурних змін плазматичної мембрани еритроцитів в результаті опромінення в досліджуваних дозах.

## ***2. Вплив іонізуючої радіації на структуру білкової компоненти апікальної та базолатеральної мембран еритроцитів тонкого кишечника.***

З урахуванням того, що структурні зміни в мембранах можуть бути обумовлені конформаційними перебудовами мембранних білків, було досліджено вплив іонізуючої радіації на конформаційний стан білкових молекул АМ та БМ еритроцитів.

В значній мірі конформаційний стан білкової молекули характеризують такі спектральні характеристики її триптофанової флуоресценції, як положення максимуму спектра флуоресценції, інтенсивність флуоресценції та ширина спектру [Демченко, 1988].

Аналіз отриманих результатів свідчить, що в результаті опромінення відбувається лише збільшення інтенсивності флуоресценції триптофанових залишків, в той час, як положення максимуму та ширина спектра флуоресценції залишались незмінними.

Підвищення інтенсивності флуоресценції білкових триптофанілів в препаратах АМ в середньому на 20% та БМ на 11% може бути зумовлено такими структурними перебудовами білкової молекули, які супроводжуються переходом триптофанових залишків в більш гідрофобну область [Демченко, 1988].

Комбіноване використання двох гасників триптофанової флуоресценції, один з яких визиває вибіркове гасіння флуоресценції поверхневих триптофанілів ( $MgCl_2$ ), а другий здатний гасити флуоресценцію триптофанілів в середині білкової матриці (акриламід) дозволило оцінити внутрішню молекулярну просторову перебудову білків апікальних мембран.

Виявлено збільшення ефективності гасіння флуоресценції триптофанілів АМ за рахунок підвищення константи Штерна-Фольмера ( $K_{sv}$ ), тобто в результаті збільшення флуктуації білкових молекул. Причому, у випадку гасіння акриламідом  $K_{sv}$  збільшується в середньому на 11%, 34% і 38%, а у випадку гасіння  $MgCl_2$  - на 23%, 53% і 73% у порівнянні з контролем, відповідно після опромінення в дозах 1,0; 2,0 та 3,0 Гр (табл.2). Більш суттєве збільшення  $K_{sv}$  при використанні  $MgCl_2$ , можливо, пов'язано також із збільшенням вкладу статичного гасіння, специфічного чи неспецифічного зв'язування іонного гасника з білком та гетерогенністю білкових флуорофорів. Виявлене в даних умовах зниження кількості триптофанових залишків, які піддаються гасінню, можна пояснити зменшенням їх доступності як завдяки конформаційним змінам білкової молекули, так і в результаті занурювання триптофанових залишків поверхневих білків мембрани в глибину ліпідної фази, що виявлено в дослідах з використанням  $MgCl_2$ .

### ***3. Вплив іонізуючої радіації на фізичні властивості плазматичної мембрани ентероцитів тонкого кишечника.***

В з'ясуванні механізмів функціонування мембранних систем важлива роль належить дослідженню взаємодії білків та ліпідів. Порушення просторової організації білково-ліпідних комплексів при дії іонізуючої радіації можуть обумовлювати функціональні зміни плазматичних мембран [Болдырев, 1985].

Таблиця 2. Вплив іонізуючої радіації на параметри гасіння флуоресценції триптофанових залишків апікальних мембран ентероцитів. I - гасіння акриламідом; II - гасіння іонами магнію ( $M \pm m, n=4 \div 5$ ).

Умови дослідіу	I		II	
	Ksv	b	Ksv	b
Контроль	4,25±0,03	0,90±0,09	38,3±0,02	0,81±0,07
Доза опромінення, Гр				
1.0	4,71±0,06*	0,83±0,07	47,4±0,04*	0,71±0,11
2.0	5,71±0,04*	0,80±0,06	58,7±0,03*	0,62±0,06*
3.0	5,88±0,05*	0,76±0,05*	66,7±0,05*	0,58±0,08*

\* -  $p < 0,05$  по відношенню до контролю

Ksv - Константа Штерна-Фольмера,  $M^{-1}$

b - частка триптофанових залишків, доступних гасінню

Для вивчення просторової організації білково-ліпідних комплексів використовували метод індуктивно-резонансного переносу енергії з триптофанових залишків мембранних білків на флуоресцентний зонд пірен, який локалізується в ліпідній фазі [Добрецов,1989].

Дані по гасінню піреном флуоресценції триптофанових залишків АМ та БМ в модифікованих координатах Штерна-Фольмера дозволяють визначити два геометричних параметри :  $b$  - частка флуоресценції донорів, які приймають участь в переносі енергії, (якщо  $b=1$ , вважається, що всі донори приймають участь в переносі енергії), та  $X$  - середня відстань між поверхнею бішару та цими донорами [Фоменко,1985] (табл.3).

В АМ частка флуоресценції триптофанових залишків, які приймають участь в переносі енергії, в контролі становить близько 0,71, а після опромінення в дозах 1,0; 2,0 та 3,0 Гр відповідно 0,70; 0,61 та 0,57. В контрольних препаратах БМ параметр  $b$  становить близько 0,90 і після опромінення в дозах 1,0; 2,0 та 3,0 Гр його величина також зменшується і становить відповідно 0,83, 0,77 та 0,74.

Виявлено переміщення в результаті опромінення центру білкової маси мембран від границі розподілу ліпід/вода в глибину ліпідної фази. В препаратах АМ таке переміщення становило 0,16 нм; 1,76 нм та 2,32 нм після опромінення в дозах 1,0; 2,0 та 3,0 Гр, а в БМ відповідно - 0,08 нм; 0,14 нм та 0,28 нм.

Ліпіди являються основою структурної організації біологічних мембран, які забезпечують властивості напівпроникливості, транспорт органічних та неорганічних сполук, експресію рецепторів та інше. Тому, фізичний стан ліпідного бішару, а саме його в'язкість - фактор, який контролює активність мембранних ферментів і лежить в основі уявленнь про унікальну регуляцію мембранозалежних процесів, опосередковану ліпідами [Болдырев,1985].

Використання методу визначення ступеню ексимеризації флуоресцентного зонду пірену при двох величинах довжини хвилі збудження дозволило оцінити зміни в'язкості вільних, які знаходяться на відстані більше ніж 3 нм від білкової молекули, та ангулярних ліпідів, які безпосередньо контактують з білковими молекулами (табл.3). Відмічена більш висока мікров'язкість ангулярних ліпідів, зв'язаних з білками, у порівнянні з рештою ліпідної маси в контрольних препаратах АМ та БМ, що узгоджується з існуючим уявленням про імобілізуючий вплив білків на вуглецеві залишки ліпідних молекул [Болдырев,1985]. Показано, що опромінення викликає зменшення структурної впорядкованості ангулярних ліпідів АМ та БМ, в той час як

Таблиця 3. Вплив іонізуючої радіації на геометричні параметри та ступінь ексимеризації пірену в апікальній (АМ) та базолатеральній (БМ) мембранах ентероцитів тонкої кишки ( $M \pm m$ ,  $n=4 \pm 5$ ).

Умови досліджу	X, нм		b		N <sub>335</sub>		N <sub>280</sub>	
	АМ	БМ	АМ	БМ	АМ	БМ	АМ	БМ
Контроль	+0,64±0,02	-1,75±0,03	0,71±0,05	0,90±0,03	0,47±0,02	0,44±0,04	0,21±0,05	0,22±0,03
Доза опромінення, Гр								
1,0	+0,47±0,04*	-1,83±0,02*	0,69±0,03	0,81±0,05*	0,46±0,03	0,41±0,05	0,28±0,02*	0,24±0,05
2,0	-1,12±0,03*	-1,89±0,03*	0,61±0,04*	0,76±0,02*	0,43±0,04	0,39±0,02	0,32±0,04*	0,25±0,02
3,0	-1,68±0,01*	-2,03±0,01*	0,57±0,02*	0,74±0,04*	0,42±0,03	0,39±0,03	0,33±0,02*	0,25±0,04

\* $p < 0,05$  по відношенню до контролю

Примітка: "-" розташування центру білкової маси в ліпідному бішарі

"+" - над поверхнею ліпідного бішару

N<sub>335</sub> - ступінь ексимеризації пірену при  $\lambda_{зб.} = 335$  нм

N<sub>280</sub> - ступінь ексимеризації пірену при  $\lambda_{зб.} = 280$  нм.

мікрів'язкість бішарових ліпідів майже не змінюється. Причому, більш виражені зміни мікрів'язкості оточення прибілкових ліпідів спостерігаються в АМ у порівнянні з БМ при опроміненні в дозах 1,0; 2,0 та 3,0 Гр. Зниження в результаті опромінення мікрів'язкості прибілкових ліпідів пов'язано, можливо, з порушенням гідрофобних взаємодій між ліпідними молекулами і білковою  $\alpha$ -спіраллю, яка іммобілізує велику кількість ліпідів.

Зменшення ефективності переносу енергії з мембранних триптофанів на пірен та зменшення доступності триптофанових залишків для гасників триптофанової флуоресценції може бути обумовлено утворенням агрегатів білкових молекул в середині бішару, підтвердженням цьому є виявлене переміщення центру білкової маси в напрямку від границі розподілу фаз ліпід/вода.

Крім того встановлено зменшення товщини ліпідного бішару в перепаратах АМ після опромінення. В контролі товщина ліпідного бішару становить  $3,78 \pm 0,05$  нм, а після опромінення в дозах 1,0 та 2,0 Гр відповідно  $3,19 \pm 0,03$  та  $2,89 \pm 0,04$  нм.

#### ***4. Радіаційноіндукована модифікація $Ca^{2+}$ - транспортуючої функції мембран ентероцитів тонкого кишечника.***

Виявлені порушення взаємозв'язку між білками та ліпідами і зменшення мікрів'язкості прибілкових ліпідів можуть свідчити про порушення функціональних властивостей мембран. Дослідження функціонального стану мембран ентероцитів оцінювали вивчаючи їх  $Ca^{2+}$ -транспортуючу здатність.

При дослідженні транспорту  $Ca^{2+}$  АМ та БМ ентероцитів, отриманих із контрольних та опромінених тварин, враховували особливості його трансмембранного перенесення цими мембранами. Відомо, що одним з основних механізмів транспорту кальцію АМ є пасивне проходження іону за електрохімічним градієнтом, необхідною стадією якого є його зв'язування цими мембранами. Транспорт  $Ca^{2+}$  БМ обумовлюється функціонуванням  $Ca^{2+}$ -АТРази [Van Os, 1987].

Аналіз наведених на рис.1 даних свідчить, що іонізуюча радіація викликає збільшення процесу накопичення  $Ca^{2+}$  препаратами АМ, а через 14 діб після опромінення в дозі 1Гр спостерігається майже повне повернення цього процесу до рівня контролю. Встановлено, що виявлені зміни відбуваються за рахунок збільшення в післярадіаційний період проникності мембран для даного іону та збільшення її  $Ca^{2+}$

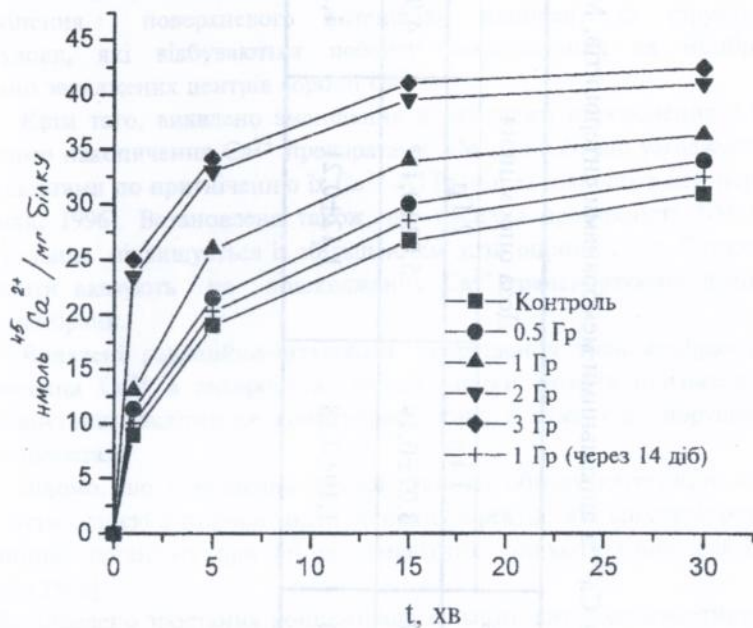


Рис. 1\* . Накопичення  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  препаратами апікальної мембрани в контролі та після опромінення.

\*- Наведені типові результати.

Таблиця 4. Параметри зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з апікальними мембранами ентероцитів,  $M \pm n$ ,  $n=4 \div 5$ .

Показник	Контроль	Доза опромінення		
		1 Гр	2 Гр	3 Гр
Константа зв'язування $K_{\text{Ca}^{2+}}$ , $10^{-3}$ М	$2,96 \pm 0,17$	$3,07 \pm 0,19$	$5,02 \pm 0,13^*$	$4,98 \pm 0,22^*$
Кількість місць зв'язування $N_{\text{Ca}^{2+}}$ , мкмоль/мг білку	$1,01 \pm 0,16$	$1,10 \pm 0,18$	$1,12 \pm 0,21$	$1,25 \pm 0,18$

\*  $p < 0,05$  відносно контролю

- зв'язуючої здатності, яку оцінювали за допомогою Са-чутливого флуоресцентного зонду хлортетрацикліну (ХТЦ).

Виявлено зміни параметрів зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з АМ, виділених із опромінених тварин, а саме: збільшення кількості місць зв'язування та константи зв'язування (табл.4). Причиною цього може бути збільшення від'ємного заряду на мембрані (на що вказує підвищення в результаті опромінення поверхневого потенціалу мембран) та структурні перебудови, які відбуваються поблизу локалізованих на мембрані від'ємно заряджених центрів сорбції  $\text{Ca}^{2+}$ .

Крім того, виявлено зменшення в результаті опромінення АТР-залежного накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  препаратами БМ (рис.2), що узгоджується з результатами по пригніченню їх  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазної активності в цей період [Хижняк, 1996]. Встановлено також, що пасивна проникність БМ для іонів кальцію підвищується із збільшенням дози опромінення. Отримані результати вказують на пошкодження  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортуючої функції даної мембрани.

Виявлені радіаційно-індуковані порушення трансмембранного перенесення  $\text{Ca}^{2+}$  в еритроцитах тонкої кишки можуть призвести до зміни внутрішньоклітинної концентрації іону, а отже і до порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу.

Відомо, що порушення збалансованості обміну клітинного  $\text{Ca}^{2+}$  може бути однією з причин цитотоксичних ефектів, які спостерігаються в тканинах організму при дії різноманітних пошкоджуючих факторів [Хансон, 1985].

Встановлено зростання концентрації вільного внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  приблизно на 32%, 62% та 63% відповідно при опроміненні в дозах 1,0; 2,0 та 3,0 Гр (рис.3), що може впливати на функціональну активність еритроцитів після опромінення.

Таким чином, аналіз одержаних результатів по вивченню фізичних властивостей плазматичної мембрани еритроцитів свідчить про те, що із збільшенням дози опромінення спостерігаються зміни структурних властивостей обох (апикальної та базолатеральної) складових частин плазматичної мембрани епітелію тонкої кишки, що може призвести до зміни їх функціональної активності, а саме, як встановлено,  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортуючої здатності.

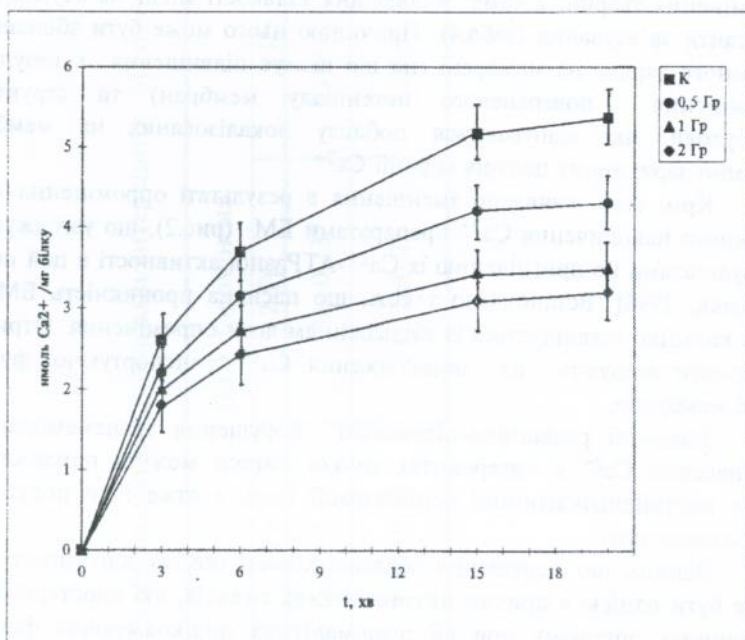


Рис.2. АТР-залежне накопичення  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  препаратами базолатеральної мембрани в контролі та після опромінення.

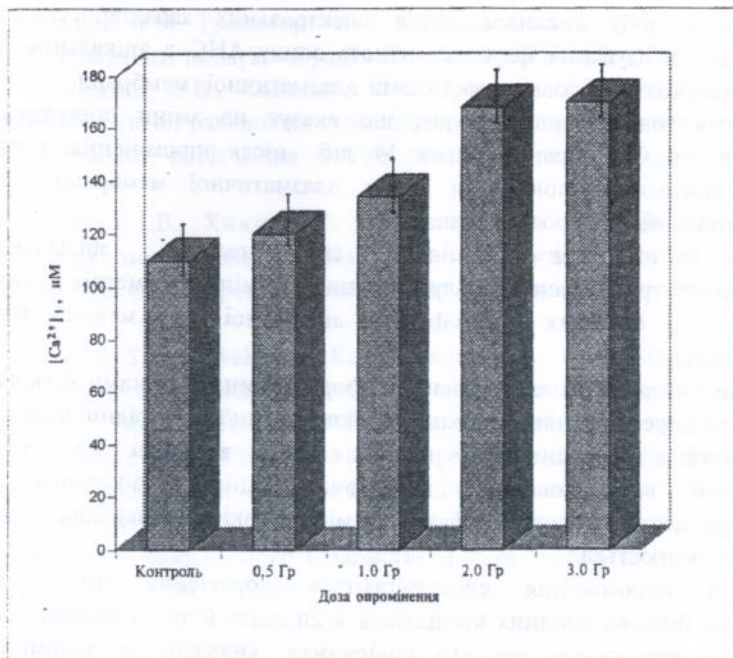


Рис.3. Внутрішньоклітинна концентрація вільного  $Ca^{2+}$  в ентероцитах тонкої кишки в контролі та після опромінення.

## Висновки

1. Одноразове рентгєнівське опромїнення в дозах 0,5; 1,0; 2,0 та 3,0 Гр через 1 добу викликає змїни спектральних характеристик та параметрїв зв'язування флуоресцентного зонду АНС з апїкальною та базолатеральною складовими частинами плазматичної мембрани ентєроцитїв тонкої кишки щурїв, що вказує на змїни поверхневої структури даної мембрани. Через 14 дїб пїсля опромїнення в дозї 1,0 Гр вимїрюванї показники стану плазматичної мембрани не вїдрїзняються вїд контрольних значень.
2. За даних умов опромїнення спостерїгається збїльшення їнтєнсивностї триптофаної флуоресценцї та змїни параметрїв гасїння флуоресценцї бїлкових триптофанїлїв апїкальної і, в меншїй мїрї, базолатеральної мембрани ентєроцитїв, обумовленї конформацїйними змїнами бїлкових молекул та перемїщенням поверхневих бїлків в глибину лїпїдної фази.
3. Їонїзуюче опромїнення у вказаних дозах викликає зменшення структурної впорядкованостї ангулярних лїпїдїв апїкальних та базолатеральних мембран, в той час як мїкров'язкїсть бїшарових лїпїдїв майже не змїнюється.
4. Пїсля опромїнення спостерїгаються порушення просторової органїзацїї бїлково-лїпїдних комплексїв в апїкальнїй та базолатеральнїй мембранах ентєроцитїв тонкого кишечника, виявленї за допомогою методу їндуктивно-резонансного переносу енергїї з мембранних триптофанїлїв на флуоресцентний зонд пїрен.
5. Виявленї радїацїйно-їндукованї порушення трансмембранного перенесення  $\text{Ca}^{2+}$  в ентєроцитах тонкої кишки за рахунок пїдвищення проникливостї плазматичної мембрани для цього їону, збїльшення  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючої здатностї апїкальних мембран, а також пригнїчення активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  базолатеральними мембранами обумовлюють зростання внутрїшньоклїтинної концентрацїї їонїв кальцїя їз збїльшенням дози опромїнення.
6. Встановленї деструктивнї змїни плазматичної мембрани ентєроцитїв тонкої кишки, якї вїдбуваються за рахунок структурних перебудов мембранних компонентїв та змїни взаємозв'язкїв мїж бїлками та лїпїдами можуть обумовлювати порушення її транспортних властивостей при дїї їонїзуючої радїацїї.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Хижняк С.В., Коваленко І.Є., Нагнибедюк В.В., Вашенко І.В., Войшіцький В.М. Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в ентероцитах тонкої кишки при дії сублетальних доз іонізуючої радіації. - Київ: "ВІПОЛ", 1996. - 44с.
2. Хижняк С.В., Коваленко І.Є., Вашенко І.В., Войшіцький В.М. Вплив іонізуючої радіації на транспортні властивості мембрани щіткової кайми тонкого кишечника // Укр. біохім. журн. - 1995. - Т.67, №4. - С.53-56
3. Вашенко І.В., Хижняк С. В., Нагнибедюк В.В., Воціцький В.М. Структурні зміни апікальної мембрани ентероцитів в результаті впливу рентгенівського випромінювання //Укр. радіолог. журн.- 1996, №1. - С.11-15.
4. Hizhnyak S.V., Kovalenko I.E., Stepanov Y.V., Vashenko I.V., Voitsitsky V.M. Changes of calcium fluxes in small intestine induced by ionising radiation // Abstr. Inter. Symp. "Biological mobility", Moscow, 1994.- P.135.
5. Хижняк С.В., Степанова Л.І., Преображенская Т.Д., Вашенко І.В. Фізико-хімічний стан мембран щіткової кайми тонкого кишечника щурів в результаті дії іонізуючого випромінювання // Тези 1-го з'їзду Українського біофізичного товариства (20-24 червня 1994р.). - Київ: Во-во Київ. у-ту, 1994. - С.244.

Аннотация.

**Вашенко И.В. Структурно-функциональное состояние плазматической мембраны энтероцитов 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, 1997.

Защищается диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук, основные положения которой изложены в 5 научных работах. В диссертации содержатся данные о воздействии ионизирующей радиации в дозах 0,5; 1,0; 2,0 и 3,0 Гр на структурно-функциональное состояние плазматической мембраны энтероцитов тонкого кишечника.

Установлено:

- изменение структуры поверхностного слоя плазматической мембраны с помощью флуоресцентного зонда АНС;
- структурные перестройки белковой компоненты и изменение пространственной организации белково-липидных комплексов плазматической мембраны энтероцитов тонкого кишечника;
- радиационно-индуцированные нарушения трансмембранного переноса  $\text{Ca}^{2+}$  в энтероцитах тонкого кишечника за счет увеличения проницаемости плазматической мембраны для данного иона, повышение  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей способности апикальных мембран, а также угнетения активного транспорта базолатеральными мембранами приводит к увеличению внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Summary.

**Vashchenko I.V. Structural-functional state of plasma membranes enterocytes of small intestine after ionizing radiation exposure (manuscript).**

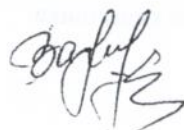
The thesis for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences (speciality 03.00.08 - radiobiology). Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of Ukraine NAS, Kiev, 1997.

The thesis for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences is defended. The results of this thesis are expose in 5 scientific publication. They have data on effect of ionizing radiation in doses 0,5; 1,0; 2,0 and 3,0 Gy on structural-functional state of plasma membranes enterocytes of small intestine.

Setting.

- the change of surfase of plasma membrane with help of fluorescent indicator ANS.
- the structural reconstructions of albumen component and change of space organisation albumen-lipid complexes of plasma membrane of enterocytes of small intestine.
- the dicturbanse of transmembran  $\text{Ca}^{2+}$  - transfer in enterocytes of small intestine by means of increase permeability plasma membrane for this ion, increase of  $\text{Ca}^{2+}$ -binding ability of apical membrane, and oppression of active transport by basolateral membranes after ionizing radiation exposure. As a result is increase of intercellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ключові слова: іонізуюче випромінювання, дози, ентероцит, апікальна та базолатеральна мембрани, флуоресцентні зонди, кальцій.



---

Підписано до друку 7.05.97р. Формат 60x84/16.  
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.  
Наклад 100. Зам. 175.

---

Відділ оперативної поліграфії  
Центру Міжнародної освіти  
227-12-75, 227-37-86

УЗ6208

AB 37.846