

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

На правах рукопису

ХИЖНЯК Світлана Володимирівна

**СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ТРАНСПОРТНІ
ВЛАСТИВОСТІ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ
ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ ПІСЛЯ ВПЛИВУ
ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ**

03.00.08 - радіобіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 1997



Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі біохімії Київського університету імені Тараса Шевченка.

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

Офіційні опоненти: доктор медичних наук,
професор **В. А. Барабой**
доктор біологічних наук,
професор **П. В. Усагук**
доктор біологічних наук,
О. М. Федоров

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

Захист відбудеться 24 червня 1997 р. о 13³⁰ 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 Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий 22 травня 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
канд. біол. наук

Г. Й. Лавренчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми: Постійно зростаюче використання джерел іонізуючої радіації в різних сферах життєдіяльності людини обумовлює актуальність в'ясування механізмів її вражаючої дії. На даний час в радіобіології накопичено значний матеріал, який стосується дії високих доз іонізуючого випромінювання на біомакромолекули, клітини, тканини, органи, організм в цілому. Але не існує достатньої кількості даних для обґрунтування уявлень про вплив на оточуючу живу природу незначного підвищення рівня радіації. Проведені на протязі останніх років дослідження показали, що відомі в радіобіології закономірності недостатні для пояснення особливостей біологічної дії низьких доз опромінення. При дії цих доз опромінення основний ефект іонізуючої радіації визначається запуском компенсаторного потенціалу клітини. Тому саме в точки зору порушення-відновлення функціонування клітинних систем слід розглядати особливості впливу низьких доз опромінення на організм.

Морфологічні та функціональні порушення клітинних мембран іонізуючою радіацією виявляються фактично відразу після опромінення як високими, так і низькими дозами, що свідчить про їх значну чутливість до дії іонізуючої радіації [Поливода Б.И. и др., 1990]. На даний час уявлення, що радіаційне ураження біомембран вносить суттєвий внесок в кінцевий радіобіологічний ефект, не викликає сумніву, хоча практично не існує даних для кількісної оцінки цього внеску і не розроблена методологія вивчення механізмів взаємодіяку між мембранними та клітинними ефектами радіації. При розгляді властивостей клітинних мембран організму, який зазнає впливу іонізуючого випромінювання, більш суттєвим може стати не стільки визначення змін певних параметрів їх функціонування, скільки виявлення взаємодіяку порушень, що при цьому спостерігаються.

Особливу увагу в радіобіології привертає стан органів, структур, процесів, що мають вирішальне значення в розвитку радіаційного пошкодження організму. Тонкий кишечник, основні функції якого полягають в розщепленні та всмоктуванні ексogenous поживних субстратів, створенні селективного бар'єру на шляху їх надходження із порожнини кишечника в кров і лімфу, а також в секреції гідролізуючих ферментів - один з найбільш радіочутливих

критичних органів, зміни функцій якого є глибокими і стійкими, може визначати навіть долю організму [Eastwood G.L., 1977; Федоровский Л.Л., 1984].

Розщеплення та транспорт поживних речовин в тонкому кишечнику в значній мірі реалізується високоспеціалізованою структурою епітеліальних клітин - ентероцитів. Дві протилежно орієнтовані мембрани ентероцита: апікальна (повернена в порожнину кишечника) та базолатеральна, містять різноманітні транспортні системи і контролюють трансклітинне та трансмембранне перенесення субстратів [Уголев А.М., 1986; Морозов И.А. и др., 1988]. В регуляції транспортних процесів тонкою кишкою суттєву роль відіграє функціонування систем транспорту іонів, зокрема іонів кальцію [Van Os C.H., 1987]. Саме з транспортом іонів та роботою іонних насосів пов'язано надходження багатьох метаболітів (в тому числі амінокислот) в клітини епітелію тонкої кишки.

З іншого боку, аналіз результатів по вивченню проблем клітинної загибелі вказує на провідну роль порушення кальцієвого гомеостазу в пошкодженні клітин [Хансон К.П., 1985], що обумовлює необхідність визначення радіаційної модифікації функціонування іон-транспортних систем. Слід відмітити нечисленність даних наукової літератури стосовно впливу іонізуючої радіації на системи транспорту іонів та метаболітів в кишечнику, механізмів порушення функцій цих систем, особливо з точки зору зміни їх структури.

На даний час накопичено різноплановий матеріал, присвячений вивченню різних сторін розвитку ураження кишечника при гострій променевої хворобі [Костеша Р.Я., 1990; Stein M. et al. 1990]. В той же час мало досліджені зміни структури та транспортних процесів в епітелії тонкої кишки в результаті дії іонізуючої радіації в дозах, значно нижчих від тих, які викликають кишкову форму променевої хвороби. Враховуючи, що одним із проявів впливу іонізуючої радіації в інтервалі низьких доз опромінення є порушення травної та всмоктувальної здатності тонкої кишки [Степанов Ю.В. та ін., 1993; Вексларський Р.З., 1994], особливу увагу слід приділити з'ясуванню структурних та функціональних змін плазматичної мембрани клітин епітелію, як однієї з можливих мішеней дії радіації на організм, що обумовлено багатосторонніми функціональними та регуляторними взаємозв'язками плазматичної мембрани з клітинним метаболізмом.

Мета та завдання дослідження: Мета роботи полягала в дослідженні структурного стану та транспортних властивостей плазматичної мембрани ентероцитів тонкої кишки і її ролі в післярадіаційному порушенні функціонування кишечника за умов впливу низьких та сублетальних доз іонізуючого випромінювання.

В зв'язку з цим були поставлені наступні завдання:

1. Оцінити особливості дії рентгенівського опромінення в дозах від 0,5 до 3,0 Гр на морфо-функціональний стан клітин епітелію тонкої кишки.
2. Дослідити вплив іонізуючої радіації на фізичні властивості апікальної та базолатеральної складових частин плазматичної мембрани ентероцитів, а саме: її поверхневих ділянок та області ліпідної фази.
3. Оцінити проникність плазматичної мембрани для іонів та метаболітів в досліджуваній післярадіаційний період.
4. Визначити активність основних ферментів плазматичної мембрани ентероцитів та виявити дію на них досліджуваних доз іонізуючої радіації.
5. Дослідити транспорт амінокислот (на прикладі нейтральних амінокислот) плазматичною мембраною ентероцитів після опромінення.
6. Дослідити транспорт іонів (на прикладі іонів кальцію) в ентероцитах тонкої кишки після дії іонізуючого випромінювання.
7. Виявити основні ланки радіаційно-індукованих змін функціонування клітин епітелію тонкої кишки в інтервалі дії доз іонізуючої радіації від 0,5 до 3,0 Гр.

Наукова новизна та практична значимість роботи:

Вперше проведено комплексне дослідження ефекту дії іонізуючої радіації в інтервалі доз від 0,5 до 3,0 Гр на структурний стан та функціональну активність тонкої кишки на клітинному і структурно-функціональному (плазматична мембрана) рівнях.

Виявлено прискорення процесу регенерації тонкої кишки в результаті дії вивчаємих доз опромінення, на що вказують дані морфологічних досліджень, а саме: вкорочення ворсинок, зменшення

кількості епітеліальних клітин, які їх вкривають, спустошення крипт і, поряд із цим - збільшення проліферативної активності стовбурних клітин. Серед епітеліальних клітин (ентероцитів, бокаловидних клітин, клітин Панета та ін.) найбільшим ультраструктурним змінам (із збільшенням дози опромінення) піддаються всмоктуючі клітини, розміщені на ворсинках.

Використання флуоресцентних зондів з різною локалізацією в мембрані (АНС та пірену) дозволило виявити різнобічні порушення фізичного стану плазматичної мембрани ентероцитів: її поверхневого шару та області ліпідної фази в результаті дії іонізуючої радіації. За даними індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) з білкових триптофанів на пірен виявлені радіаційно-індуковані порушення просторової організації біково-ліпідних комплексів плазматичної мембрани ентероцитів, які проявляються в переміщенні центру бікової маси в глибину ліпідної фази, зменшення доступності білкових триптофанів для пірену та ефективної товщини гідрофобної області ліпідного бішару, що вказує на можливість утворення агрегатів білкових молекул в середині мембрани.

Показано, що опромінення в досліджуваних дозах викликає зменшення мікрров'язкості анулярних ліпідів апікальної та базолатеральної мембран, в той час як для бішарових ліпідів цей показник майже не змінюється.

Досліджено структурний стан бікової компоненти плазматичної мембрани ентероцитів в результаті дії іонізуючої радіації. Виявлена більш суттєва модифікація білків апікальної мембрани, яка обумовлена конформаційними змінами (внаслідок переміщення поверхневих білків в ліпідну фазу) та збільшенням внутрішньомолекулярної динаміки білків цієї мембрани.

Вперше, за допомогою методу ІРПЕ вдалося оцінити не тільки структурні перебудови плазматичної мембрани ентероцитів тонкої кишки після дії іонізуючого випромінювання, а також фізичний стан цієї мембрани в нормі. Відмічена більш висока мікрров'язкість анулярних ліпідів у порівнянні із загальною ліпідною фазою як апікальної, так і базолатеральної мембран.

Встановлено неоднотипову відповідь різних складових частин плазматичної мембрани (апікальної та базолатеральної) на дію опромінення, яка стосується їх структурного стану, транспортної та ферментативної активності.

Показано, що опромінення в досліджуваних дозах впливає на

транспортну здатність ентероцитів. Бивчення різних шляхів транспорту нейтральних амінокислот препаратами апікальної мембрани показало, що опромінення викликає прискорення пасивної дифузії фенілаланіну та лейцину поряд із пригніченням (особливо для лейцину) їх вторинно активного Na^+ -залежного транспорту. Припускається існування в апікальній мембрані альтернативної, специфічної для фенілаланіну Na^+ -залежної системи транспорту, що може обумовлювати меншу чутливість транспорту цієї амінокислоти до дії іонізуючої радіації.

Встановлено, що порушення Ca^{2+} -гомеостазу в ентероцитах тонкої кишки, яке приводить до збільшення концентрації іонів кальцію в цитозолі (із підвищенням дози опромінення) полягає в прискоренні транспорту Ca^{2+} апікальною мембраною, пригніченні активного транспорту базолатеральною мембраною та зміні його вмісту у внутрішньоклітинних структурах.

Показано, що радіаційно-індуковане підвищення Ca^{2+} -транспортуючої функції апікальної мембрани обумовлено збільшенням її Ca^{2+} -зв'язуючої здатності в результаті зростання кількості і/або доступності Ca^{2+} -зв'язуючих ділянок, а також збільшення проникності мембрани для цього іону.

Отримані результати дають змогу з'ясувати особливості механізмів транспорту іонів кальцію та амінокислот в ентероцитах тонкої кишки та його можливі післярадіаційні порушення.

Виявлені радіаційно-індуковані структурно-функціональні порушення епітелію тонкої кишки на різних рівнях його організації розширюють уявлення про початкові механізми дії низьких доз опромінення і створюють нові методичні підходи для адекватної оцінки радіобіологічних ефектів, які при цьому спостерігаються.

Проведені дослідження можуть сприяти виявленню закономірностей адаптивної відповіді організму на дію пошкоджуючих факторів, в тому числі іонізуючого випромінювання в нелетальних дозах. Отримані результати про взаємозв'язок порушення будови та функції тонкої кишки, як на рівні клітин, так і плазматичних мембран в результаті іонізуючого опромінення дають підстави для розробки профілактичних м'яких і терапевтичних основ фармакологічної корекції функціональних та адаптивних можливостей організму в умовах променевого впливу.

Декларація конкретного особистого внеску дисертанта у розробку наукових результатів, що виносяться на захист.

Дисертанту належить основна ідея роботи по дослідженню впливу низьких доз іонізуючої радіації на структурно-функціональні властивості тонкої кишки, організація проведення досліджень та розробка методів їх проведення. Дисертант приймала безпосередню участь в дослідженні морфо-функціональних характеристик тонкої кишки, транспортних функцій плазматичної мембрани ентероцитів її структурного стану та фізичних властивостей. Самостійно аналізувала весь отриманий матеріал, формулювала основні положення та висновки роботи. Готувала до друку всі наукові роботи, що відображають результати дисертації. Опублікувала дві одноособові монографії.

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, яке проявляється при ультраструктурному дослідженні стану епітеліальних клітин, та прискорення процесів відновлення епітеліального шару.

2. Іонізуюча радіація в умовах дослідження призводить до зміни транспортної функції епітеліальних клітин, про що свідчать порушення їх Ca^{2+} -гомеостазу та модифікація процесів транспорту нейтральних амінокислот алікальною мембраною ентероцитів.

3. В результаті дії іонізуючої радіації в дозах від 0,5 до 3,0 Гр виявлені зміни структурного стану та фізичних властивостей плазматичної мембрани ентероцитів, які стосуються білкових молекул, анулярних ліпідів та взаємодії мембранних компонентів.

4. Ефект дії іонізуючої радіації в дозах 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 Гр проявляється на всіх рівнях організації тонкої кишки - тканинному, клітинному та мембранному. Виявлені радіаційно-індуковані перебудови клітинної мембрани, порушення структурної організації клітин поряд із зміною їх функціональної активності вказують на взаємозв'язок виявлених порушень.

Публікації та апробація роботи. Основний зміст роботи викладено в 19 наукових публікаціях.

Результати дисертації доповідалися на 1-му з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), Міжнародному симпозиумі "Біологічна рухомість" (Пушино, 1994), Радіобіологічному з'їзді (Дніпропетровськ, 1995), 3-й конференції біохіміків Узбекистану (Ташкент, 1996), VI конференції країн СНГ "Проблеми екології и експлуатації об'єктів енергетики" (Севастополь, 1996), наукових конференціях професорсько-викладацького складу Київського університету імені Тараса Шевченка (Київ, 1994, 1995, 1997).

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури (4 розділи), матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення (7 розділів), заключення, висновків, списку використаної літератури (283 джерел). Робота викладена на 239 сторінках машинопису, містить 48 рисунків і 17 таблиць.

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 - 2×10^{-4} А/кг, фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, сила струму - 10 мА, напруга - 200 кВ, шкіро-фокусна відстань - 50 см.

Тварин декапітували через 1 добу (в ряді досліджень через 14 діб) після опромінення. Цей термін вибрано по декількох причинах. По-перше, за 1 добу ще не відбувається повного оновлення ентероцитів тонкої кишки [Морозов І.А., 1988]. По-друге, згідно з даними [Вродский Р.А., 1987] більш виражений вплив іонізуючої радіації на функціонування тонкокишкового епітелію проявляється саме через 1 добу, а вже через 3 доби при дії доз менше 10 Гр спостерігається відновлення структурно-функціональних властивостей тонкої кишки.

Об'єктом дослідження був відділ тонкої кишки - порожня кишка. В роботі використовували ділянки тонкої кишки, суспензію ізольованих клітин ентероцитів та везикульовані препарати апікальної та базолатеральної мембран.

Для вивчення морфологічних показників готували парафінові

зрізи, які забарвлювали гематоксиліном Вемера та еозином. Для отримання напівтонких зрізів об'єкти заливали в епон. Вимір попереочного 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) з прискорюючою напругою 60 кВ.

Отримання суспензії епітеліальних клітин тонкої кишки проводили загальновідомим методом [Watford M., 1979; Сухомлинов В.Ф., 1983]. Везикульовані препарати апікальної та базолатеральної мембран ентероцитів отримували згідно з методиками [Hopfer U., 1973; Miller A., 1981; Chijssen W.E., 1982]. Вміст білку в об'єктах дослідження визначали за методом Лоурі із співав. [Lowry O.H. et al., 1951], а кількість клітин в пробі, забарвлюючи трипановим синім згідно [Evans E.M., 1971], з використанням камери Горяєва.

Чистоту препаратів апікальної (АМ) та базолатеральної (БМ) мембран, із контрольних і опромінених тварин, оцінювали електронно-мікроскопічним [Lewis G., 1977] та біохімічним (по активності маркерних ферментів цих мембран) методами. Мембранні препарати АМ та БМ характеризуються достатнім ступенем чистоти, мають вигляд везикульованих структур, які в контролі не відрізняються від отриманих із опромінених тварин. Так, наприклад, визначено, що в контролі внутрішній об'єм везикульованих препаратів АМ становить $4,3 \pm 0,2$ мкл/мг білку і близький до розрахованого з використанням Д-глюкози [Braun H.J. et al., 1984]. Для препаратів АМ, отриманих із опромінених в дозах 1,0 та 2,0 Гр тварин, він становить відповідно $4,5 \pm 0,1$ та $4,0 \pm 0,1$ мкл/мг білку.

Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази та Na^+ , K^+ -АТФази визначали так, як вказується в роботах [Ghijsen W.E., 1980; Harms V., 1980].

Інтенсивність флуоресценції АНС та параметри зв'язування зонду вимірювали згідно [Владимиров Ю.В., Добрецов Г.Е., 1980]. Просторову організацію білково-ліпідних комплексів в плазматичній мембрані ентероцитів оцінювали методом індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) з мембранних білків на пірен [Добрецов Г.Е., 1981, 1989]. Дослідження мікров'язкості ліпідів плазматичної мембрани ентероцитів проводили з використанням методу незалежного

визначення в'язкості зв'язаних ліпідів (безпосередньо контактуючих з білковими глобулами) та загальних ліпідів згідно [Литвинов И.С., 1982, Дергунов А.Д. и др., 1982; Galla H.J., 1979].

Вимірювання триптофанової флуоресценції білків плазматичної мембрани ентероцитів проводили згідно [Лакович Д., 1986; Демченко А.П., 1988].

Вивчення поглинання, виходу та зв'язування Ca^{2+} препаратами апікальної мембрани проводили радіоізотопним методом згідно [Miller A., 1981; Miller A., Tung S., 1982]. Розчин накопичення (об'єм 0,3 мл), містив 10 мМ HEPES-Tris (pH 7,5 при 25°C), 100 мМ Д-сорбітол, 1 мМ CaCl_2 (при дослідженні зв'язування іона з мембраною концентрація Ca^{2+} становила 0,1-4,0 мМ) та $^{45}\text{CaCl}_2$ з молярною радіоактивністю 0,3 мКі/ммоль. Реакцію ініціювали внесенням 0,05 мг білку в пробу.

АТФ-залежне накопичення $^{45}\text{Ca}^{2+}$ оцінювалось в препаратах ЕМ, як вказується в роботі [Chijssen W.E., 1982] та в оброблених дигітоніном суспензії епітеліальних клітин згідно [Velasco G., 1986].

Накопичення фенілаланіну та лейцину АМ вивчалось 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 O., 1989] в розчині (об'єм 0,5 мл), який 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 фенілаланін або 0,1 мМ лейцин. Реакцію ініціювали внесенням 0,05 мг білку в пробу. Дифузії амінокислот оцінювали за кількістю накопиченого міченого субстрату препаратами АМ, які попередньо були навантажені неміченим фенілаланіном або лейцином.

Реакцію зупиняли шляхом швидкого фільтрування через мембранні фільтри. Радіоактивність препаратів вимірювали на рідинносцинтиляційному лічильнику SL-4000 фірми "Intertechnique" (Франція).

Концентрацію вільного Ca^{2+} в клітинах визначали за допомогою флуоресцентного зонду INDO-1/AM [Grynkiewicz G., 1984; Орлов С.Н. 1989]. Проникність АМ ентероцитів для Na^+ , K^+ та Ca^{2+} оцінювали по величині дифузного мембранного потенціалу, який виникав при розсіюванні штучно створених градієнтів цих іонів, методом синтетичних проникаючих іонів [Либерман Е.А., 1969].

Статистична обробка даних проводилась загальноприйнятими методами варіаційної статистики [Плохинский В.М., 1981].

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 пострадіаційний період (1 доба) зменшується висота ворсинок (в середньому на 10-15%), їх кількість на 1 мм довжини кишки (в середньому на 25-28%) та площа перерізу ядер ентероцитів (на 24-26%) без суттєвої різниці в дозах опромінення. Зменшення розмірів ентероцитів більш виражене тільки при опроміненні в дозах 2.0 і 3.0 Гр (приблизно на 20%).

Разом з цим, через 1 добу після опромінення спостерігається достовірне зменшення популяції клітин крипт, які утворюють її проліферативну зону на фоні зростання їх мітотичної активності. Слід зазначити, що особливо висока проліферативна активність стовбурних клітин тонкої кишки (в порівнянні з контролем) спостерігалась при опроміненні в дозі 1.0 Гр і вона залишалась підвищеною навіть на 14 добу після опромінення в цій дозі, коли інші морфометричні показники структурного стану тонкої кишки повертались до контрольних значень.

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

Так, через 1 добу після опромінення в дозі 0.5 Гр реєструються зони незначної деструкції в епітелії. За цей час повного оновлення клітинного складу ще не відбувається, некротизовані клітини ще не встигають еліминуватися, стає помітний їх вихід в порожнину органа. Спостерігається локальне ураження строми, її набряк.

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

При опроміненні в дозі 2.0 Гр спостерігається ще більш виражені прояви дистрофії і внутрішньоклітинного некробіозу цитоплазми, головним чином циліндричних (всмоктуючих) клітин епітелію тонкої кишки. Однак, ділянки їх некрозу рідкі і локалізовані.

При опроміненні в дозі 3.0 Гр спостерігаються збільшення частоти виникнення некрозу як цілих клітин епітеліального шару і строми, так і фрагментів клітин (парціальний некроз) на фоні поширеної дистрофії органодів у більшості клітинних елементів.

Найбільшим змінам при даних дозах опромінення піддаються ентероцити (всмоктуючі клітини) та їх клітинні елементи. Ентероцити із збільшенням дози опромінення до 3,0 Гр при поширених явищах дистрофії мітохондрій і вакуолізації гранулярного ендоплазматичного ретикулуму в деяких ділянках позбавлені щіткової кайми. Менш виражені зміни ультраструктури органодів бокаловидних клітин при даних дозах опромінення.

В ділянках місцезнаходження недиференційованих камбіальних елементів епітелію на дні крипт клітини також зазнають деяких ультраструктурних змін під впливом іонізуючої радіації, але виявляються вони тільки із збільшенням дози опромінення до 2,0 - 3,0 Гр і виражені менше, ніж зміни зрілих епітеліальних клітин.

Отже, в післярадіаційний період поряд із пошкодженням чи загибеллю зрілих епітеліальних клітин на ворсинці, вкороченням ворсинок та зменшенням їх кількості на одиницю довжини, спостерігається спустошення крипт та зростання проліферативної активності стовбурних клітин крипт. Тобто, особливістю дії даних доз опромінення є прискорення процесів фізіологічної регенерації тонкої кишки.

2. Структурні особливості плазматичної мембрани ентероцитів тонкої кишки в післярадіаційний період.

Подальші дослідження були направлені на виявлення біохімічних основ радіаційно-індукованої деструкції ентероцитів тонкої кишки. Особливу увагу приділено з'ясуванню структурних та функціональних змін плазматичної мембрани клітин епітелію, як можливої мішені дії радіації.

Структурний стан плазматичної мембрани ентероцитів, отриманих з контрольних та опромінених тварин, оцінювали за

допомогою флуоресцентних зондів, які локалізуються в різних ділянках мембрани: АНС - в основному, на поверхні мембранного шару, а пірен - в зоні жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів [Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е., 1980].

Визначені спектральні характеристики флуоресцентного зонду АНС, зв'язаного з АМ еритроцитів (інтенсивність флуоресценції, квантовий вихід флуоресценції, параметри зв'язування зонду та зміна поверхневого потенціалу мембрани) вказують на наявність інтегральних процесів (зміна мікрооточення зонду, збільшення поверхневого заряду, структурні перебудови мембранних компонентів, тощо), які протікають в АМ в результаті опромінення в дозах від 0,5 до 3,0 Гр (табл.1).

Слід відмітити, що через 14 діб після опромінення в дозі 1,0 Гр параметри зв'язування АНС з АМ не відрізнялись від контрольних значень, що вказує на тимчасовий характер виявлених при цій дозі опромінення її структурних змін.

Аналогічні результати по впливу іонізуючого опромінення в дозах від 0,5 до 3,0 Гр були отримані при дослідження зв'язування АНС з препаратами БМ.

Оскільки молекула АНС, яка локалізується в полярній області мембрани, утворює комплекси з білковими і ліпідними молекулами [Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е., 1980], то отримані дані по вивченню взаємодії флуоресцентного зонду АНС з АМ та БМ можуть свідчити про таку зміну поверхневої структури плазматичної мембрани еритроцитів при опроміненні, яка може обумовлюватись модифікацією як ліпідної компоненти в зоні полярних голівок та гліцеринових залишків фосфоліпідів, так і мембранних білків.

В значній мірі про конформаційний стан білкової молекули можуть свідчити спектральні характеристики її триптофанової флуоресценції, а саме: положення максимуму спектра флуоресценції, інтенсивність та ширина спектру флуоресценції [Лакович Д., 1986]. Виявлено, що в результаті опромінення збільшується тільки інтенсивність флуоресценції триптофанових залишків білкових молекул в препаратах АМ (приблизно на 22 %) та БМ (приблизно на 12%) (табл.2). Це може бути зумовлено такими структурними перебудовами білкової молекули, які супроводжуються переходом триптофанових залишків в більш гідрофобну область.

Таблиця 1. СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДУ АНС, ЗВ'ЯЗАНОГО З АПІКАЛЬНОЮ МЕМБРАНОЮ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ (M±m, n=5-6).

ПОКАЗНИК	Контроль	ДОЗА ОПРОМІНЕННЯ, Гр				
		0,5	1,0	2,0	3,0	1,0 (14 діб)
Інтенсивність фл-ції, відн.од.	1,00	0,95 ± 0,02	0,92 ± 0,05*	0,82 ± 0,05*	0,75 ± 0,05*	0,98 ± 0,02
Константа зв'язування, мкм ⁻¹	5,8 ± 0,2	5,4 ± 0,3	4,8 ± 0,3*	2,1 ± 0,4*	1,2 ± 0,4*	5,9 ± 0,5
Кількість місць зв'язування, нмоль/мг білку	8,5 ± 0,3	9,5 ± 0,4	10,0 ± 0,3*	12,5 ± 0,3*	13,5 ± 0,5*	8,6 ± 0,4
Квантовий вихід фл-ції (Q), відн.од.	1,00	0,91 ± 0,02	0,86 ± 0,01*	0,81 ± 0,02	0,73 ± 0,02*	0,89 ± 0,02*
Зміна поверхневого потенціалу ΔΨ, мВ	0	2,71±0,05*	3,63±0,06*	3,78±0,05*	3,68± 0,04*	2,83±0,05*

* - P < 0,05 по відношенню до контролю

Примітка: ΔΨ - Ψ_к - Ψ_о, де Ψ_к - поверхневий потенціал мембрани в контролі, Ψ_о - після опромінення.

Вільш докладний аналіз поверхневої доступності білкових триптофанілів та внутрішньомолекулярної динаміки білкових молекул АМ проводили на основі вивчення гасіння триптофанової флуоресценції білків зовнішніми гасниками (акриламідом та іонами магнію).

Встановлено, що після опромінення збільшується кількість триптофанілів, які недоступні для гасіння. Зменшення доступності може відбуватись внаслідок агрегації внутрішньомембранних білкових молекул (не виключені зміни білкової конформації), а також в результаті занурювання триптофанових залишків поверхневих мембранних білків в глибину ліпідної фази і зниження їх доступності для води, оскільки виявлено, що в результаті опромінення кількість флуорофорів, доступних гасінню іонами магнію, зменшується в більшій мірі, ніж доступних акриламиду. Крім того, спостерігається збільшення внутрішньомолекулярної рухливості білкових молекул, що обумовлює підвищення ефекту гасіння флуоресценції білків АМ ентероцитів із опромінених тварин зовнішніми гасниками.

Функціонування різноманітних мембранних систем залежить від динамічних властивостей їх ліпідного оточення. Воно характеризується специфічними фізико-хімічними параметрами, які обумовлені як структурою внутрішньомембранної частини білка, так і самих ліпідів [Дергунов А.Д. и др., 1984]. Причому, саме інтегральні зміни фізичних характеристик ліпідного бішару більш суттєві в розумінні функціонування мембран, ніж варіації в хімічному складі ліпідної фази [Владимиров Ю.А., 1980].

Методом індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) з триптофанових залишків мембранних білків на флуоресцентний зонд пірен, який локалізується в ліпідній фазі, виявлено переміщення центру білкової маси в мембранах у напрямку від межі розподілу ліпід/вода в ліпідну фазу відповідно в середньому на $1,7 \text{ \AA}$; $17,6 \text{ \AA}$ та $23,2 \text{ \AA}$ в АМ після опромінення в дозах $1,0$; $2,0$ та $3,0 \text{ Гр}$ і менш суттєве в БМ на $0,8 \text{ \AA}$; $1,4 \text{ \AA}$ та $2,8 \text{ \AA}$ після опромінення в даних дозах. Поряд з цим, спостерігається зменшення частки білків в препаратах АМ і БМ, які приймають участь в переносі енергії та ефективності переносу енергії, за рахунок збільшення відстані між донором та акцептором (табл.2). В той же час було встановлено

Таблиця 2. СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АПІКАЛЬНОЇ ТА БАЗОЛАТЕРАЛЬНОЇ
МЕМБРАН ЕНТЕРОЦИТІВ В КОНТРОЛІ ТА ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ
(M±m; n=4-5)

Умови досліджу	F ₀ , від. од.	β	X, Å	N ₂₈₀	N ₃₃₅
Апікальна мембрана					
Контроль	1,0	0,71±0,05	+6,4 ±0,3	0,22±0,02	0,44±0,02
Доза опромінення, Гр:					
1,0	1,20±0,04*	0,62±0,03*	+4,7 ±0,2*	0,28±0,03*	0,43±0,02
2,0	1,22±0,02*	0,58±0,04*	-11,2±0,3*	0,32±0,02*	0,41±0,03
3,0	1,24±0,02*	0,57±0,03*	-16,8±0,4*	0,36±0,02*	0,41±0,03
Вазолатеральна мембрана					
Контроль	1,0	0,90±0,04	-17,5±0,3	0,22±0,03	0,40±0,02
Доза опромінення, Гр:					
1,0	1,10±0,03*	0,81±0,03	-18,3±0,4	0,25±0,02	0,39±0,03
2,0	1,13±0,02*	0,78±0,04*	-18,9±0,3*	0,26±0,03	0,38±0,02
3,0	1,14±0,02*	0,74±0,03*	-20,3±0,2*	0,26±0,03	0,38±0,02

* - P < 0,05 по відношенню до контролю

Примітка: F₀ - інтенсивність триптофаної флуоресценції білків. Величина F₀ виражена у відносних одиницях порівняно з контролем. β - частка білків, які приймають участь в переносі енергії; X - розташування центру цих білків в ліпідній фазі (" - "), чи над поверхнею ліпідної фази (" + "). N - ступінь ексімеризації пірену при збудженні довжиною хвилі 280 нм та 335 нм.

зменшення ефективної товщини гідрофобної області ліпідного шару АМ із збільшенням дози опромінення. В контролі вона становить приблизно $3,78 \pm 0,05$ нм. Після опромінення в дозах 1,0 та 2,0 Гр ефективна товщина становить відповідно $3,19 \pm 0,03$ та $2,89 \pm 0,04$ нм.

Враховуючи існування в плазматичній мембрані декількох ліпідних пулів з різними фізичними властивостями: неоднорідного бішарового (прямо не взаємодіючого з білками) та в достатній мірі однорідного анулярного, їх в'язкість оцінювали по ступеню ексимеризації флуоресцентного зонду пірену при двох величинах довжини хвилі збудження (відповідно 335 та 280 нм). В контролі ступінь ексимеризації пірену N_{280} менше ніж N_{335} , що вказує на більш високу мікрров'язкість ліпідів, які безпосередньо контактують з білковими глобулами, у порівнянні з рештою ліпідної маси (табл.2). Це узгоджується із існуючими уявленнями про імобілізуючий вплив білків на вуглецеві залишки гліколіпідів [Dunker O., 1979; Kang Y., 1979]. Показано, що опромінення викликає зменшення структурної впорядкованості анулярних ліпідів АМ та, в меншій мірі ВМ, в той час як мікрров'язкість загальної ліпідної фази майже не змінюється (табл.2). Зниження в результаті опромінення мікрров'язкості ліпідної фази в прибілковій області вказує на порушення гідрофобних взаємодій між ліпідними молекулами і білковою α -спіраллю.

Отже, такі зміни фізичних властивостей мембрани, а саме: зменшення товщини гідрофобної області ліпідного бішару, поверхневої доступності триптофанів, переміщення центру білкової маси в ліпідний бішар, зменшення ефективності переносу енергії з триптофанових залишків на пірен, в результаті збільшення відстані між донором та акцептором, - свідчать про можливість утворення агрегатів білкових молекул, в результаті порушення гідрофобних взаємодій білків з ліпідами, і виникнення неспецифічних білок-білкових взаємодій (наприклад, в результаті окислення SH-груп або конформаційних змін білків чи ліпідів).

Зупиняючись на можливих причинах, здатних опосередковувати структурну модифікацію плазматичної мембрани еритроцитів (в більшій мірі АМ) із збільшенням дози опромінення, слід відмітити зміни динамічних властивостей мембранних компонентів (білків та ліпідів), їх топографії та порушення гідрофобних білок-ліпідних взаємодій.

Результатом зміни взаємозв'язку між білками і ліпідами та зменшення мікрор'язкості приблизових ліпідів може бути виявлене збільшення проникливості АМ для іонів та метаболітів, можливо за рахунок виникнення неспецифічних каналів для їх проходження.

В табл.3 представлені результати по визначенню проникливої здатності АМ для ряду іонів після дії іонізуючої радіації. За 100% приймали проникливість АМ в контролі для K^+ . Тоді для Na^+ ця величина складає близько 66%, а для Ca^{2+} - 20%, (враховували, що електричний заряд Ca^{2+} дорівнює +2).

Прониклива здатність апікальної мембрани ентероцитів, отриманих через 1 добу після опромінення тварин в дозах 0.5, 1.0, 2.0 та 3.0 Гр, зростає для K^+ відповідно в 1.5, 2.5, 2.7 та 2.9 рази, для Na^+ - в 1.4, 1.8, 2.1 та 2.3 рази, а для Ca^{2+} - в 1.4, 1.8, 2.0 та 2.2 рази.

З процесами первинно-активного транспорту іонів (Na^+, K^+, Ca^{2+}) пов'язаний транспорт інших метаболітів (в тому числі амінокислот) в тонкій кишці.

Таблиця 3. **ПРОНИКЛИВА ЗДАТНІСТЬ АПІКАЛЬНОЇ МЕМБРАНИ ЕНТЕРОЦИТІВ ДЛЯ K^+ , Na^+ ТА Ca^{2+} (M±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^+	67±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

За 100% приймали проникливість для K^+ в контролі.

3. Транспорт нейтральних амінокислот апікальною мембраною ентероцитів тонкої кишки після впливу іонізуючої радіації.

Дослідження впливу іонізуючої радіації на транспорт амінокислот АМ (який являється початковим і швидкість - лімітуючим етапом їх трансепітеліального проходження) були направлені на з'ясування особливостей функціонування систем транспорту нейтральних амінокислот: на прикладі моноаміномонокарбонової амінокислоти - L-лейцину та циклічної - L-фенілаланіну. Крім того, враховували, що транспорт амінокислот АМ ентероцитів тонкої кишки може здійснюватися за допомогою декількох механізмів: Na^+ -залежного транспорту, Na^+ -незалежного транспорту, а також шляхом дифузії [Stevens B.R. et al., 1982; Кушак Р.И., 1983; Satoh O. et al., 1989].

Результати по накопиченню L-лейцину та L-фенілаланіну АМ ентероцитів тонкої кишки з контрольних та опромінених тварин свідчать (рис.1), що в присутності Na^+ -градієнту кінетика накопичення субстрату у всіх вивчених препаратах характеризується наявністю ефекту "овершуту". Максимальний рівень накопичення амінокислот АМ із контрольних та опромінених тварин досягається через 15 с інкубації, а через 60 хв не спостерігається процес Na^+ -залежного накопичення. Ефект "овершуту" зумовлений наявністю електрохімічного градієнту іонів натрію на мембрані, який швидко розсіюється завдяки здійсненню Na^+ /субстратного котранспорту.

Отримані дані вказують, що із збільшенням дози опромінення зменшується швидкість накопичення L-лейцину та L-фенілаланіну Na^+ -залежним шляхом (рис.1). Однією із причин цього може бути прискорення розсіювання Na^+ -градієнту на мембрані внаслідок більшої проникності АМ для іонів після впливу опромінення, оскільки при цьому не виявлено зміни спорідненості Na^+ -залежної транспортної системи до субстрату. Опромінення в дозі 2,0 та 3,0 Гр однаково впливає на Na^+ -залежний транспорт амінокислот, а через 14 діб після опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігається часткове відновлення Na^+ -залежного транспорту L-лейцину (рис.1).

Враховуючи, що Na^+ -залежне накопичення L-лейцину АМ піддається більшому пригніченню після впливу іонізуючої радіації, при подальших дослідженнях було вивчено перехресне інгібування процесу накопичення цих амінокислот препаратами АМ із контрольних та опромінених тварин. Отримані дані свідчать, що Na^+ -залежний

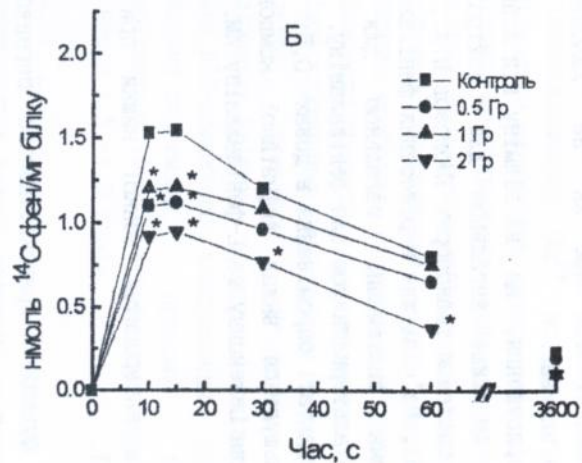
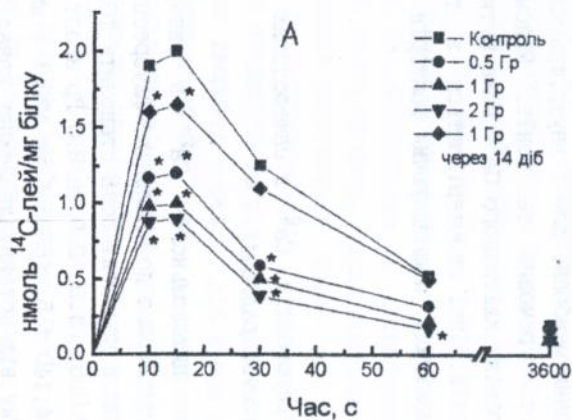


Рис. 1. Кінетика Na^+ -залежного накопичення L-[^{14}C]лейцину (А) та L-[^{14}C]фенілаланіну (Б) препаратами апікальної мембрани в контролі та після опромінення.

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

транспорт L-лейцину як в контролі, так і після опромінення інгібується L-фенілаланіном, в той час як на накопичення L-фенілаланіну L-лейцин не впливає.

Поясненням цьому є припущення, що на відміну від лейцину, який переноситься через АМ лише загальною для нейтральних амінокислот Na^+ -залежною системою транспорту [Морозов І.А., 1988; Mailliard M.E. et al., 1995], Na^+ -залежне перенесення фенілаланіну може здійснюватися двома системами: загальною для всіх нейтральних амінокислот та альтернативною для фенілаланіну.

Встановлено, що в результаті опромінення в дозах 0,5; 1,0, 2,0 та 3,0 Гр збільшується вклад дифузійної компоненти трансмембранного перенесення L-лейцину та L-фенілаланіну АМ.

4. Транспорт Ca^{2+} в ентероцитах тонкої кишки при дії іонізуючої радіації.

Оскільки здійснення функції трансклітинного перенесення іонів та субстратів в значній мірі визначається високоспеціалізованою структурою ентероцитів, це обумовлює необхідність дослідження радіаційного пошкодження транспортної функції не тільки плазматичних мембран, але і внутрішньоклітинних систем, які регулюють потік речовин та іонів. Відомо, що порушення збалансованості обміну клітинного Ca^{2+} може бути однією з причин цитотоксичних ефектів, які спостерігаються в тканинах організму при дії різноманітних пошкоджуючих факторів [Хансон К., 1985].

Внутрішньоклітинний перерозподіл Ca^{2+} в ентероцитах тонкої кишки після дії іонізуючої радіації.

Визначення концентрації цитозольного Ca^{2+} в ентероцитах тонкої кишки (за допомогою чутливого до кальцію флуоресцентного зонду INDO-1/AM) показало, що в контролі вона становить $105 \pm 5 \text{ нМ}$, а після опромінення в дозах 0.5, 1.0, 2.0 та 3.0 Гр зростає і становить відповідно 120 ± 4 ; 140 ± 5 ; 165 ± 5 та $170 \pm 4 \text{ нМ}$.

Враховуючи, що на відміну від потенціалзалежних каналів, які регулюються гормонами, надходження кальцію в ентероцити через АМ -

повільне, яке незначно змінює концентрацію цитозольного кальцію [Van Os H.,1987]. Тому зростання концентрації вільного внутрішньоклітинного Ca^{2+} до 168 - 170 нМ, можливо, впливає на функціональну активність ентероцитів після опромінення.

Відомо, що підвищення рівня вільного Ca^{2+} в цитоплазмі може розвиватися за рахунок мобілізації внутрішньоклітинних депо, або в результаті надходження іонів кальцію до клітин через плазматичну мембрану [Авдотин В.П.,1994].

Вивчення процесів енергозалежної акумуляції кальцію внутрішньоклітинними структурами ентероцитів, з використанням обробленої розчином дигітоніну суспензії ізольованих епітеліальних клітин, показало: іонізуюча радіація призводить до зниження АТФ-залежного накопичення Ca^{2+} внутрішньоклітинними мембранними системами, причому більш суттєвий ефект спостерігається із збільшенням дози опромінення до 2.0 - 3.0 Гр пересічно в 1.5 - 1,6 разів.

Ca^{2+} - транспортуюча властивість плазматичної мембрани ентероцитів тонкої кишки після впливу іонізуючої радіації.

Транспорт Ca^{2+} через епітеліальні клітини тонкої кишки здійснюється і регулюється завдяки узгодженій роботі Ca^{2+} -транспортуючих систем плазматичної мембрани. Початковою і швидкістю-лімітуючою стадією його трансепітеліального перенесення є транспорт іону АМ [Van Os H.,1987; Takito Y.,1990].

Дослідження накопичення Ca^{2+} везикульованими препаратами АМ, отриманими із контрольних і опромінених тварин, вказує на залежність цього процесу, який протікає з насиченням, від часу. Стан рівноваги досягається через 30 хв інкубації при 25⁰ С (рис.2). В результаті дії іонізуючої радіації спостерігається підвищення швидкості та рівня накопиченого Ca^{2+} препаратами АМ із опромінених тварин, а через 14 діб після опромінення в дозі 1,0 Гр процес накопичення Ca^{2+} майже не відрізняється від контролю.

Оскільки зв'язування іонів кальцію є важливим етапом його трансмембранного перенесення, було досліджено вплив іонізуючого опромінення на Ca^{2+} -зв'язуючу здатність АМ. Встановлено зростання кількості ділянок зв'язування Ca^{2+} різних типів. Причому виявлено, що це відбувається за рахунок збільшення їх доступності. Константа дисоціації Ca^{2+} -зв'язуючих ділянок не змінюється в

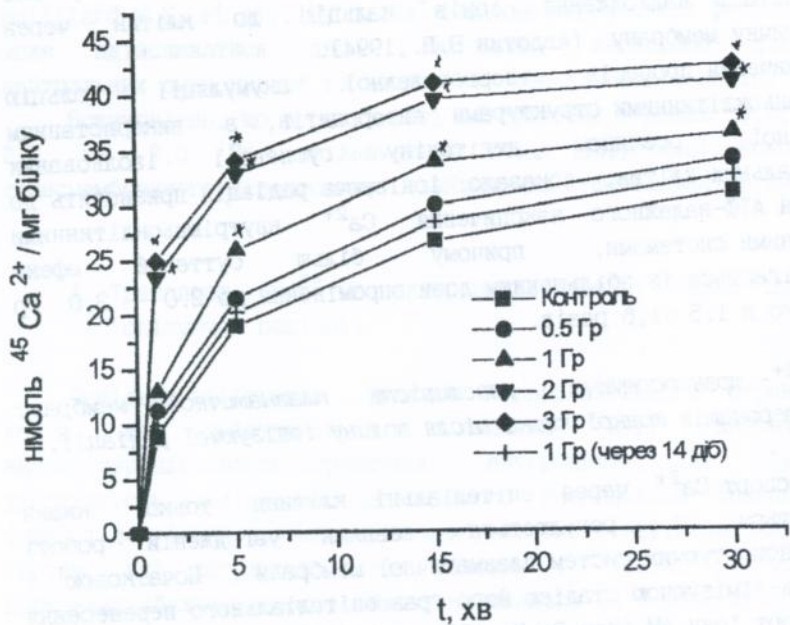


Рис. 2 . Накопичення $^{45}\text{Ca}^{2+}$ препаратами апікальної мембрани в контролі та після опромінення.

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

результаті опромінення.

Показано (табл. 4), що в результаті опромінення збільшення швидкості накопичення Ca^{2+} препаратами АМ супроводжується відповідним підвищенням ємності Ca^{2+} -зв'язуючих ділянок низької спорідненості. Наближення кількості ділянок зв'язування до контрольного рівня через 14 діб після опромінення корелює з відновленням Ca^{2+} -транспортуючої здатності АМ в цей період. Крім того, процес транспорту Ca^{2+} мембранними препаратами, виділеними із опромінених тварин характеризується збільшенням максимальної швидкості накопичення (V_{max}) без зміни константи Міхаеліса (K_m). Таким чином, радіаційно-індуковане зростання швидкості трансмембранного перенесення іонів кальцію відбувається внаслідок збільшення проникливості мембрани для іону, а також зростання кількості і/або підвищення доступності Ca^{2+} -зв'язуючих ділянок низької спорідненості, які можливо приймають участь в транспорті іонів кальцію.

Можна передбачити, що дані зміни відбуваються внаслідок пострадіаційної модифікації мембранного матриксу, що сприяє виявленню додаткових від'ємно заряджених груп (ймовірно фосфатних та карбоксильних) в білкових та ліпідних молекулах АМ, збільшуючи тим самим їх доступність для іонів кальцію. Це свідчить на користь існуючої гіпотези про ліпідний контроль транспорту Ca^{2+} апікальною мембраною еритроцитів, згідно з якою [Van Os H., 1987; Braun H.J., 1984] зміни в ліпідному матриксі призводять до відкриття існуючих в мембрані Ca^{2+} -каналів або специфічних транспортних систем. Причому, якщо вважати, що транспорт Ca^{2+} через АМ може відбуватись по Ca^{2+} -специфічним білковим каналам [Nemere I. et al., 1982; Nemere I. et al., 1986], то виявлені структурні зміни білкових молекул, збільшення їх внутрішньомолекулярної флуктуації, або модифікація заряджених груп може в свою чергу привести до прискорення трансмембранного перенесення іонів кальцію в результаті дії даних доз опромінення.

Вивчення накопичення Ca^{2+} препаратами БМ із контрольних та опромінених тварин також показало залежність цього процесу від часу, стан рівноваги якого спостерігається через 15-20 хв інкубації. Представлені в табл. 5 кінетичні параметри процесу накопичення Ca^{2+} БМ свідчать, що в результаті опромінення зменшується як початкова швидкість АТФ-залежного накопичення, так і максимальний рівень активно накопиченого Ca^{2+} . Крім того, при

Таблиця 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТУ Ca^{2+} ПРЕПАРАТАМИ АПІКАЛЬНОЇ
МЕМБРАНИ ЕНТЕРОЦИТІВ В КОНТРОЛІ ТА ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ
($M \pm m$; $n=4-6$).

Умови дослідю	Початкова швидкість накопичення V_0 , нмоль Ca^{2+} /мг білку хв	Параметри зв'язування Ca^{2+}	
		Kd ($\times 10^{-3}\text{M}$)	n, нмоль Ca^{2+} /мг білку
Контроль	$9,5 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,07$	$46,0 \pm 3,5$
Доза опромінення, Гр:			
0,5	$11,5 \pm 0,6^*$	$1,1 \pm 0,06$	$57,1 \pm 4,3^*$
1,0	$16,5 \pm 0,6^*$	$1,4 \pm 0,08$	$103,0 \pm 7,5^*$
2,0	$25,5 \pm 1,0^*$	$1,4 \pm 0,06$	$110,4 \pm 7,8^*$
3,0	$26,4 \pm 0,9^*$	$1,4 \pm 0,06$	$108,5 \pm 7,3^*$
1,0 через 14 діб	$10,0 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,04$	$70,2 \pm 6,5^*$

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

Примітка:

n - кількість ділянок зв'язування Ca^{2+} низької спорідненості
Kd - константа дисоціації.

даних дозах опромінення спостерігається прискорення процесу пасивного надходження Ca^{2+} до препаратів БМ (на що внаслідок збільшення рівня АТФ-незалежного накопичення Ca^{2+} препаратами БМ із опромінених тварин) (табл.5).

Отримані дані по зменшенню в результаті опромінення активного накопичення Ca^{2+} узгоджуються з результатами по пригніченню Ca^{2+} -АТФазної активності препаратів БМ в цей період (табл. 6) і свідчать про пошкодження Ca^{2+} -транспортуючої функції даної мембрани.

Активність іон-транспортуючих систем плазматичної мембрани еритроцитів після дії іонізуючої радіації.

Зупиняючись на впливі іонізуючого випромінювання на функціонування іон-транспортуючих систем плазматичної мембрани еритроцитів, слід відмітити пригнічення ферментативної активності Са-АТФази в препаратах АМ із опромінених тварин. Крім того, виявлено суттєве зменшення активності Na^+, K^+ -АТФази та Са-АТФази (поряд із пригніченням активного транспорту іонів кальцію) в препаратах БМ (табл.6). Причому, структурні зміни БМ менш виражені після впливу іонізуючої радіації в порівнянні з АМ і стосуються, в основному, конформаційних змін білкових молекул та порушень білок-ліпідних взаємодій. Очевидно, що в результаті дії різноманітних факторів (в тому числі іонізуючої радіації), які приводять до модифікації мембранних компонентів, змінюється алостеричний контроль мембраною мембранозв'язаних ферментів [Дергунов А.Д. та ін.,1984]. Причому, навіть локальні зміни ліпідного матриксу та взаємодії білків і ліпідів в мембрані, структурні зміни білкових молекул мембранних інтегральних систем суттєво впливають на їх функціональну активність, що саме і спостерігається при функціонуванні іон-транспортуючих систем в БМ.

При порівнянні впливу іонізуючої радіації на Ca^{2+} -транспортуючу здатність плазматичної мембрани еритроцитів та таких високоспеціалізованих мембранних структур, як мембрани саркоплазматичного ретикулула (СР) - головна фізіологічна функція яких полягає в трансмембранному перенесенні іонів кальцію - також було відмічено, що пригнічення Ca^{2+} -транспортуючої здатності цих мембран в післярадіаційний період (1 доба) в значній мірі

Таблиця 5. КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ АТФ-ЗАЛЕЖНОГО ТА АТФ-НЕЗАЛЕЖНОГО НАКОПИЧЕННЯ Ca^{2+} ПРЕПАРАТАМИ БАЗОЛАТЕРАЛЬНОЇ МЕМБРАНИ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ

($M \pm m$, $n=3-5$)

Параметри	Контроль	Доза опромінення, Гр		
		0,5	1,0	2,0
АТФ - залежне накопичення				
Початкова швидкість (V_0) нмоль Ca^{2+} /мг білку хв	$0,65 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,05^*$	$0,26 \pm 0,06^*$	$0,18 \pm 0,06^*$
Рівень максимального накопичення (P_{\max}) нмоль Ca^{2+} /мг білку	$3,6 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3^*$	$1,5 \pm 0,5^*$	$0,65 \pm 0,6^*$
АТФ - незалежне накопичення				
Рівень накопичення нмоль Ca^{2+} /мг білку 3хв	$1,6 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,3^*$	$2,8 \pm 0,3^*$

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

обумовлено структурною модифікацією білкової молекули Са-АТФази - найбільш важливого компоненту системи транспорту іонів кальцію в СР. Аналізуючи проведені дослідження, можна відмітити існування загальних радіаційних основ порушень функціонування такої іон-транспортуючої мембранної системи, як Са-АТФаза. Вони полягають в конформаційних змінах білкової молекули, модифікації прибілкових ліпідів, порушеннях взаємозв'язку білків та ліпідів.

Таблиця 6. АКТИВНІСТЬ АТФаза В АПІКАЛЬНІЙ ТА БАЗОЛАТЕРАЛЬНІЙ МЕМБРАНАХ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ ПІСЛЯ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ
(M±m, n=4-6)

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ МКМОЛЬФ _н /МГ білку·год	Контроль	ДОЗИ ОПРОМІНЕННЯ, Гр		
		0,5	1,0	2,0
Апікальна мембрана				
Ca ²⁺ -АТФаза	1,86±0,06	1,08 ± 0,06*	0,24 ± 0,01*	залишки
Mg ²⁺ -АТФаза	20,5±1,4	19,8 ± 1,3	19,3 ± 1,4	19,9±1,5
Базолатеральна мембрана				
Ca ²⁺ -АТФаза	0,90±0,03	0,52 ± 0,02*	0,30 ± 0,01*	залишки
Mg ²⁺ -АТФаза	17,5±1,2	16,0 ± 0,9	15,0 ± 0,95*	14,5±1,0*
Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза	1,44±0,06	1,14±0,05*	0,72±0,04*	0,33±0,02*

* - P < 0,05 по відношенню до контролю

ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА

Підсумовуючи отримані результати, слід відмітити, що ефект дії опромінення в дозах від 0,5 до 3,0 Гр проявляється на всіх рівнях структурно-функціональної організації епітелію тонкої кишки і посилюється із збільшенням дози опромінення, що вказує на взаємозв'язок виявлених порушень структури та функції. Причому ці зміни носять тимчасовий характер, оскільки на 14 добу після опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігається відновлення основних показників стану клітин до контрольного рівня.

Порівняльний аналіз результатів досліджень із застосуванням різних методологічних підходів дозволяє виділити основні механізми початкових радіаційно-індукованих змін, що відбуваються

в тонкій кишці при дії досліджуваних доз опромінення. Різносторонні пошкодження в епітелії тонкої кишки спостерігаються при дозі опромінення 1.0 Гр (в меншій мірі при 0,5 Гр), які включають дистрофічні та некробіотичні зміни ультраструктури клітин епітелію (в основному ентероцитів), структурні зміни плазматичної мембрани, порушення в транспорті іонів та амінокислот. Опромінення в дозі 2.0 Гр підсилює ефекти впливу радіації, що спостерігаються, які суттєво не відрізняються і при дії дози 3.0 Гр. Однак результати досліджень ультраструктурного стану епітеліальних клітин тонкої кишки свідчать, що після опромінення в дозі 3.0 Гр частіше спостерігається виникнення некрозу, який охоплює все більшу кількість клітин епітелію, розміщених не тільки на ворсинці, але й у глибині крипт.

Аналізуючи зміни основних показників структурно-функціонального стану як епітеліальних клітин, так і мембранних структур, в даних умовах дослідження, було виявлено нелінійну залежність ефекту дії радіації від дози (в інтервалі доз 0,5 - 3,0 Гр). Цю залежність ефекту від дози можна пояснити на основі уявлення про існування відмінності між дозами, які спричиняють пошкодження в біооб'єктах та системах, що ініціюють їх відновлення.

Загальновізвано, що в кожній живій клітині існують регуляторні системи, які забезпечують компенсаторні реакції організму у відповідь на тимчасові зміни впливу зовнішнього середовища. Тому основний внесок впливу низьких доз опромінення визначається запуском компенсаторного механізму клітини.

Дослідження біохімічних основ радіаційної модифікації клітинних мембран показало взаємозв'язок змін структури мембран і їх функціональної (а саме транспортної) здатності, що може являтися критерієм оцінки впливу іонізуючої радіації як на клітини, так і орган в цілому.

Проведення досліджень на шляху вивчення механізмів впливу опромінення, при якому спостерігаються процеси як порушення, так і репарації, можуть сприяти виявленню закономірностей адаптивної відповіді організму на дію пошкоджуючих факторів, в тому числі іонізуючого опромінення.

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 явищах дистрофії та некрозу клітинних елементів і клітин тонкокишкового епітелію (яким в більшій мірі піддаються дозрілі ентероцити), зменшення кількості всмоктуючих клітин на ворсинці поряд із зростанням проліферативної активності стовбурних клітин крипт.
2. Іонізуюча радіація у вказаних дозах викликає зміни спектральних характеристик та параметрів зв'язування флуоресцентного зонду АНС з апікальною та базолатеральною складовими частинами плазматичної мембрани ентероцитів тонкого кишечника щурів, що вказує на зміни поверхневої структури даної мембрани.
3. В результаті дії іонізуючого випромінювання виявлені наступні зміни фізичних властивостей плазматичної мембрани: зменшення поверхневої доступності білкових триптофанілів, переміщення центру білкової маси в ліпідний бішар, зменшення товщини гідрофобної області ліпідної фази, зниження ефективності переносу енергії з триптофанових залишків на пірен, в результаті збільшення відстані між ними, що вказує на порушення гідрофобних взаємодій білків з ліпідами і можливість утворення агрегатів білкових молекул в середині мембрани.
4. Іонізуюче опромінення у вказаних дозах приводить до зменшення структурної впорядкованості анулярних ліпідів апікальної та базолатеральної мембран, в той час як мікрров'язкість бішарових ліпідів майже не змінюється.
5. За даних умов опромінення спостерігається збільшення проникливості апікальної мембрани ентероцитів для іонів (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) та амінокислот.
6. В результаті дії іонізуючої радіації пригнічується транспорт нейтральних амінокислот (L- фенілаланіну та L- лейцину) Na^+ -залежним шляхом. Відмічена можливість існування альтернативної Na^+ -залежної системи для транспорту фенілаланіну в апікальній мембрані тонкої кишки.
7. Показано, що порушення Ca^{2+} -гомеостазу в ентероцитах тонкої кишки (із підвищенням дози опромінення) полягає в

прискоренні транспорту Ca^{2+} апікальною мембраною, пригніченні активного транспорту базолатеральною мембраною та перерозподілу його вмісту у внутрішньоклітинних структурах, що приводить до збільшення концентрації іонів кальцію в цитозолі.

8. Радіаційно-індуковане зростання швидкості трансмембранного перенесення Ca^{2+} апікальною мембраною ентероцитів відбувається внаслідок збільшення проникності мембрани для іону та зростання кількості і/або доступності Ca^{2+} -зв'язуючих ділянок, які приймають участь в транспорті Ca^{2+} .
9. Встановлені деструктивні зміни плазматичної мембрани ентероцитів (в більшій мірі апікальної мембрани) полягають в зміні динамічних властивостей мембранних компонентів, їх топографії та модифікації взаємозв'язків між білками та ліпідами і можуть обумовлювати порушення транспортних властивостей плазматичної мембрани та пригнічення ферментативної активності транспортних АТФаз плазматичної мембрани при дії іонізуючої радіації.
10. Виявлені зміни основних показників структурно - функціонального стану епітеліальних клітин тонкої кишки і мембранних структур ентероцитів збільшуються із підвищенням дози опромінення від 0,5 до 3,0 Гр, що свідчить про взаємозв'язок виявлених порушень. Показано відновлення цих показників до контрольного рівня на 14 добу після опромінення в дозі 1,0 Гр.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Хижняк С.В. Радіочутливість клітин епітелію тонкої кишки. - К.: В-во Київ. ун-ту, 1997. - 148 с.
2. Хижняк С.В. Транспорт нейтральних амінокислот мембранами щіткової кайми тонкої кишки після впливу іонізуючої радіації - К.: В-во Ін-ту змісту і мет. навчання (Мін. освіти України), 1996. - 37 с.
3. Хижняк С.В., Коваленко І.Є., Нагнибедюк В.В., Ващенко І.В., Войцицький В.М. Транспорт Ca^{2+} в ентероцитах тонкої кишки при дії сублетальних доз іонізуючої радіації. - К.: В-во Ін-ту змісту і мет. навчання (Мін. освіти України), 1996. - 37с.
4. Хижняк С.В., Коваленко І.Є., Войцицький В.М. Кальцій-

- транспортируюшая способность мембран щеточной каймы энтероцитов тонкого кишечника после воздействия ионизирующего облучения // Укр. биохим. журн. - 1997. - Т. 69, N1. - С. 41-46.
5. Hizhnyak S.V. The effect of X-ray irradiation on ionized calcium concentration in enterocytes of rat small intestine // Вісник Наук. Дослід. - 1997. - N 1. - С. 81-82.
 6. Hizhnyak S.V., Voitsitsky V.M., Kucherenko N.E. Ionizing radiation induced changes in the functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase from rabbit skeletal muscles reconstructed into liposomes // Membr. and Cell Biol. - 1996. - V. 10, N 2. - P. 225-233.
 7. Хижняк С.В., Войцицкий В.М., Остапченко С.Р., Кучеренко Н.Е. Влияние ионизирующей радиации на активность Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума скелетных мышц кролика // Укр. биохим. журн. - 1990. - Т. 62, N2. - С. 58-63.
 8. Хижняк С.В., Войцицкий В.М., Кучеренко Н.Е. Структурные изменения мембран саркоплазматического ретикулума скелетных мышц на раннем этапе рентгеновского облучения // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 63, N5. - С. 113-117.
 9. Хижняк С.В., Коваленко І.Є., Ващенко І.В., Войцицкий В.М. Вплив іонізуючої радіації на транспортні властивості мембран щіткової кайми тонкої кишки // Укр. біохім. журн. - 1995. - Т. 67, N4 - С. 53-57.
 10. Хижняк С.В., Войцицкий В.М., Кучеренко Н.Е. Индуцируемые ионизирующей радиацией изменения функциональных свойств реконструированной в липосомы Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума скелетных мышц кролика // Биологические мембраны. - 1996. - Т. 13, N2 - С. 208-215.
 11. Ващенко І.В., Хижняк С.В., Нагнибедюк В.В., Войцицкий В.М. Структурні зміни апікальної мембрани ентероцитів в результаті впливу рентгенівського випромінювання // Український радіологічний журн. - 1996. - N4. - С. 79-80.
 12. Хижняк С.В., Войцицкий В.М., Коваленко І.Є., Кучеренко М.Є. Проникливість мембран щіткової кайми тонкого кишечника щурів для іонів кальцію після впливу рентгенівського випромінювання // Доповіді НАН України. - 1994. - N7. - С. 146-148.
 13. Хижняк С.В., Нагнибедюк В.В., Повук Л.М., Степанов Ю.В., Войцицкий В.М., Кучеренко М.Є. Мітотична активність стовбурних клітин тонкого кишечника щурів після впливу низьких доз іоні-

- зуючої радіації //Доповіді НАН України-1996.- №7.-С.144-146.
14. Войцицький В.М., Хижняк С.В., Степанов Ю.В., Остапченко С.Г., Кучеренко Н.Е. Пассивный транспорт Ca^{2+} и липидный состав мембран саркоплазматического ретикулума в ранний период лучевого поражения //Респ. межвед. сб. "Молек. генет. и биофиз." - 1990, Вып. 15.- С.60-64.
15. Войцицький В.М., Гаврилей В.І., Назаренко М.М., Хижняк С.В. Вміст Са-АТФази в мембранах саркоплазматичного ретикулуму на ранніх етапах дії іонізуючої радіації// Вісник Київ. ун-ту.- 1993.- Вип. 25.- С.21-24.
16. Hижnyak S.V., Kovalenko I.E., Stepanov Y.V., Vaschenko I.V., Voitsitsky V.M. Changes of calcium fluxes in small intestine induced by ionizing radiation//Abst. International Symposium "Biological Mobility".- Pushchino, 1994, P.177.
17. Хижняк С.В., Степанова Л.І., Преображенська Т.Д., Ващенко І.В. Фізико-хімічний стан мембран щіткової кайми тонкого кишечника щурів в результаті дії іонізуючого випромінювання //Тези І з'їзду Укр. біофізичного товариства.- К.: В-во Київ. ун-ту, 1994, С.244.
18. Вулавин Л.А., Векслярский Р.З., Войцицкий В.М., Асламова Л.И., Кошарский К.Г., Хижняк С.В. Проблемы экологического мониторинга на загрязненных радионуклидами территориях после аварии на Чернобыльской АЭС // Тезисы VI конференции стран СНГ "Проблемы экологии и эксплуатации объектов энергетики" сентябрь 1996 г., С.56-57.
19. Хижняк С.В., Войцицький В.М. Транспорт кальция и аминокислот в энтероцитах тонкого кишечника при воздействии ионизирующей радиации // Тезисы 3-ей Конференции биохимиков Узбекистана 11-13 ноября 1996 г., с.89.

Аннотація

Хижняк С.В. Особенности структуры и транспортных свойств плазматической мембраны энтероцитов тонкого кишечника после воздействия ионизирующей радиации (рукопись).

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.08 - радиобиология. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, 1997.

Защищается дисертационная работа, основные положения которой изложены в 19 научных публикациях, посвященных выяснению особенностей функционирования тонкой кишки при воздействии ионизирующей радиации в дозах от 0,5 до 3,0 Гр. Выявлены разносторонние изменения в эпителии тонкой кишки после облучения, которые включают дистрофические изменения ультраструктуры клеток эпителия (в основном энтероцитов), нарушение транспорта ионов и аминокислот, структурную модификацию плазматической мембраны энтероцитов. Особое внимание уделено изучению взаимосвязи нарушений структурного состояния плазматической мембраны энтероцитов и функционирования мембранных систем при воздействии ионизирующей радиации.

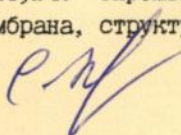
Summary

Hizhnyak S.V. Peculiarities of structure and transport properties of enterocyte plasma membrane of small intestine after ionizing radiation influence (manuscript).

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

The thesis which main principles are stated in 19 scientific papers is defended. It presents research data concerning the study of the functional peculiarities of small intestine after ionizing radiation influence in doses of 0,5 - 3,0 Gy. The versatile changes in small intestine epithelium after irradiation including the dystrophic changes of the ultrastructure of the epithelial cell (mainly enterocytes), the defect of the ion and aminoacids transport and structural disorder of enterocyte plasma membrane are revealed. The special attention is focused on the investigation of the interconnection of the direct damage of structural state of enterocyte plasma membrane and functional disorders of membrane systems after ionizing radiation influence.

Ключові слова: іонізуюче опромінення, тонкий кишечник, ентероцити, плазматична мембрана, структура, транспорт.



437026

АВ 37.904

Підписано до друку 16.05.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,6. Обл.-вид. арк. 1,6.
Наклад 100. Зам. 185.

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