

УДК: 577.446.616.36.341

Структурний стан мембран мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів за дії екзогенних чинників

С.В.Хижняк¹, В.А.Грищенко², Л.І.Степанова¹, А.О.Прохорова¹, В.М.Войціцький²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка (Київ, Україна),

²Національний університет біоресурсів і природокористування України (Київ, Україна)
hsv@univ.kiev.ua

Результати проведених досліджень свідчать про структурну модифікацію внутрішньої мембрани мітохондрії ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів щурів за дії іонізуючої радіації та кадмієвої інтоксикації. За цих умов введення тваринам біологічно активної добавки БАД FLP-MD призводить до стабілізації мітохондріальних мембран, що проявляється в структурній впорядкованості їх поверхневого шару, ліпідного та білкового компонента. Показано, що дія БАД FLP-MD опосередковується впливом на ліпідну компоненту мітохондріальної мембрани.

Ключові слова: ліпосомальна форма БАД FLP-MD, іонізуюча радіація, кадмій, тонка кишка, гепатоцити, мітохондрії, мікров'язкість.

Структурное состояние мембран митохондрий энтероцитов тонкой кишки и гепатоцитов при действии экзогенных факторов

С.В.Хижняк, В.А.Грищенко, Л.И.Степанова, А.О.Прохорова, В.М.Войцицкий

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о структурной модификации внутренней мембраны митохондрий энтероцитов тонкой кишки и гепатоцитов крыс в условиях действия ионизирующей радиации и при кадмиевой интоксикации. В этих условиях использование биологически активной добавки БАД FLP-MD приводит к стабилизации митохондриальных мембран, о чем свидетельствует структурное упорядочение ее поверхностного слоя, липидного и белкового компонента. Показано, что действие БАД FLP-MD опосредуется влиянием на липидную компоненту митохондриальной мембраны.

Ключевые слова: липосомальная форма БАД FLP-MD, ионизирующая радиация, кадмий, тонкий кишечник, гепатоциты, митохондрии, микровязкость.

The structural state of the small intestine and hepatocytes mitochondrial membrane after the influence of exogenic factors

S.V.Khyzhnyak, V.A.Grischenko, L.I.Stepanova, A.O.Prokhorova, V.M.Voitsitsky

The obtained results indicate the structural modification of the inner mitochondrial membrane of rat small intestine and hepatocytes after X-ray irradiation and cadmium intoxication. The administration of the biologically active supplement BAS FLP-MD in these conditions leads to stabilization of the structural state of the inner mitochondrial membrane as evidenced by structural ordering of membrane surface area, its lipid and protein components. It has been shown that BAS FLP-MD effect is mediated by membrane lipid component.

Key words: liposomal form of BAS FLP-MD, cadmium, X-ray irradiation, small intestine, hepatocytes, mitochondria, microviscosity.

Вступ

Постійний зріст техногенного навантаження на живі організми потребує вивчення механізмів дії чинників навколишнього середовища та розробки методів захисту. Біологічні мембрани – плазматичні та внутрішньоклітинні – виступають альтернативною мішенню для ініціювання відповіді організму на зовнішній вплив різноманітних хімічних агентів (важких металів) та іонізуючої радіації (Эйдус, 2001). Морфологічні та функціональні порушення мембран виявляються практично відразу при дії зовнішніх агентів, навіть у відносно низьких дозах (Бурлакова и др., 1996).

Мембрана є кооперативною системою, зміни в якій варто розглядати з позицій теорії слабких взаємодій. Це означає, що навіть слабкі зміни в топографії молекул ліпідів та білків (основних компонентів мембран), взаємозв'язках між ними можуть стати джерелом перебудови структури мембрани в цілому і зміни клітинного метаболізму за багатьма показниками (Геннис, 1997). Саме тому важливе значення має оцінка структурно-динамічного стану клітинних мембран за дії на організм

чинників фізичної та хімічної природи (Хижняк і др., 2006; Хижняк, 2010) та його корекція за використання біологічно активних препаратів, а саме ліпосомальної форми БАД FLP-MD, що проявляє мембранотропні властивості (Грищенко та ін., 2009).

Метою роботи було дослідити структурні властивості мітохондріальної мембрани ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів щурів за разової дії іонізуючого випромінювання (в дозі 2,0 Гр) чи кадмію (1,0 мг/кг маси тіла), а також при використанні ліпосомальної форми БАД FLP-MD.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження були проведені на безпорідних щурах-самцях, вагою 180–200 гр, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин розподіляли на групи: 1-ша група – контрольні тварини; 2-га група – тварин тотально разово опромінювали рентгенівськими променями в дозі 2,0 Гр; 3-тя група – тваринам перорально вводили БАД FLP-MD (14,0 мг/кг маси тіла) протягом 5 діб, а потім опромінювали в дозі 2,0 Гр; 4-та група – перорально вводили протягом 14 діб кадмію хлорид (щоденно в дозі 1,0 мг Cd/кг маси тіла); 5-та група – тваринам вводили БАД FLP-MD протягом 5 діб, а потім на тлі введення БАД FLP-MD вводили кадмію хлорид в дозі 1,0 мг/кг (протягом 14 діб). Щурів декапітували після закінчення експерименту.

Опромінення проводили на установці РУМ-17 з тубусом за наступних умов: потужність дози 0,34 Гр/хв, фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, сила струму 10 mA, напруга 200 кВ, шкіро-фокусна відстань 50 см. Біологічно активна добавка (БАД FLP-MD) містить фосфоліпіди із маслянки (побічний продукт переробки молока), природні моно- і поліненасичені жирні кислоти, а також вітаміни (α -токоферол і ретинолу ацетат) (Мельничук, Грищенко, 2007).

Препарати внутрішньої мембрани мітохондрії отримували згідно (Практикум по біохимії, 1989). Вміст білка визначали за методом Лоурі та співавт. (Lowry et al., 1951).

Структурний стан мітохондріальної мембрани оцінювали, як детально описано в попередніх роботах (Хижняк, 2010; Хижняк і др., 2006), використовуючи флуоресцентні зонди, що локалізуються в різних ділянках мембрани: АНС (1-анілінонафталін-8-сульфонат) – переважно на поверхні мембранного бішару (на межі ліпід–вода), пірен – в зоні жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів (Добрецов, 1989; Владимиров, Добрецов, 1980). Дослідження мікрів'язкості ліпідів мембран проводили з використанням методу незалежного визначення в'язкості анулярних ліпідів (N_{280}) та загальної ліпідної фази (N_{335}). При цьому враховували існування залежності ступеню ексімеризації пірену, який вбудовано в ліпідну фазу мембрани, від в'язкості його оточення (Добрецов, 1989). Інтенсивність флуоресценції триптофанових залишків мембранних білків та параметри її гасіння зовнішнім нейтральним полярним гасником акриламідом вимірювали згідно (Лактович, 1986, Демченко, 1988). Експериментальні дані оброблялись загальноприйнятими методами статистики (Кучеренко та ін., 2001).

Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено незначне зниження інтенсивності флуоресценції АНС при зв'язуванні з мембранними препаратами мітохондрій клітин слизової оболонки тонкої кишки в умовах опромінення чи надходження кадмію (табл. 1). Крім того, змінюються параметри зв'язування зонду з мембраною: константа зв'язування ($K_{АНС}$) та кількість місць зв'язування ($N_{АНС}$). Величина $K_{АНС}$ збільшується в результаті опромінення у середньому на 11% відносно контрольних значень. Показник $N_{АНС}$ достовірно зменшується на 37% за дії іонізуючої радіації та на 18% внаслідок дії кадмію, відносно відповідних контрольних значень. При застосуванні БАД FLP-MD за умов дії екзогенних чинників спостерігається нормалізація досліджуваних показників.

Подібні дослідження проведено і для мітохондріальної мембрани гепатоцитів в умовах опромінення чи надходження кадмію (табл. 1). Встановлено незначне зниження інтенсивності флуоресценції АНС при зв'язуванні з мембранними препаратами, яке у результаті опромінення становить у середньому 10%. Крім того, виявлено зниження величини $N_{АНС}$ за умов опромінення чи надходження кадмію на 21% та 24% відповідно. Попереднє ведення БАД FLP-MD призводить до нормалізації досліджуваних показників. Не виявлено впливу БАД FLP-MD на всі досліджувані показники структурного стану контрольних мембран (дані не наведено).

Зміни величин константи зв'язування зонду та числа місць зв'язування АНС з мембраною є відображенням інтегральних процесів (зміни мікрооточення зонду, поверхневого заряду, структурних перебудов тощо), які протікають в мембрані (Владимиров, Добрецов, 1980). Оскільки молекула АНС локалізується в полярній області мембрани, утворюючи комплекси з білковими та ліпідними молекулами, отримані результати стосовно взаємодії флуоресцентного зонду АНС з мембранами свідчать про зміну поверхневої структури мембрани, що може обумовлюватися модифікацією як

ліпідної компоненти, так і мембранних білків. Використання БАД FLP-MD чинить мембраностабілізуючий вплив на структуру модифікованих мембран.

Таблиця 1.

Спектральні характеристики флуоресцентного зонду АНС, зв'язаного з внутрішньою мембраною мітохондрій за дії іонізуючої радіації, кадмію та БАД FLP-MD ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджу	Інтенсивність F, відн. од.	Константа зв'язування, мкМ^{-1}	Кількість місць зв'язування, нмоль/мг білка
Ентероцити тонкої кишки			
Контроль	1,0	$21,0 \pm 0,8$	$10,7 \pm 0,4$
Опромінення	$0,92 \pm 0,03^*$	$23,1 \pm 0,6^*$	$7,8 \pm 0,6^*$
Опромінення + БАД	$0,97 \pm 0,05$	$22,0 \pm 0,7$	$9,7 \pm 0,7$
Cd	$1,06 \pm 0,02$	$19,1 \pm 0,8$	$8,8 \pm 0,6^*$
Cd + БАД	$1,0 \pm 0,03$	$21,0 \pm 1,0$	$9,8 \pm 0,4$
Гепатоцити			
Контроль	1,0	$18,7 \pm 1,4$	$12,7 \pm 0,4$
Опромінення	$0,90 \pm 0,03^*$	$17,6 \pm 1,5$	$10,2 \pm 0,3^*$
Опромінення + БАД	$0,96 \pm 0,04$	$16,8 \pm 1,3$	$11,4 \pm 0,3$
Cd	$0,92 \pm 0,05$	$19,6 \pm 1,5$	$9,6 \pm 0,5^*$
Cd + БАД	$0,96 \pm 0,03$	$18,8 \pm 1,3$	$13,8 \pm 0,3$

Примітка: * – $P \leq 0,05$ відносно контролю.

При дослідженні мікров'язкості ліпідної компоненти мембран встановлено, що за умов опромінення зростає ступінь ексимеризації пірену в мембранних препаратах СМЧ ентероцитів тонкої кишки на 33% (N_{335}) та 23% (N_{280}), а гепатоцитів – на 21% (N_{335}). Це свідчить про зменшення мікров'язкості загальної ліпідної фази та анулярних ліпідів досліджуваних мембран (табл. 2). Введення БАД FLP-MD призводить до нормалізації досліджуваних показників в мембранних препаратах мітохондрій.

Таблиця 2.

Ступінь ексимеризації пірену в препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій за дії іонізуючої радіації, кадмію та БАД FLP-MD для загальної ліпідної фази (N_{335}) та анулярних ліпідів (N_{280}) ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджу	N_{335} , відн. од.	N_{280} , відн. од.
Ентероцити тонкої кишки		
Контроль	$0,27 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,01$
Опромінення	$0,36 \pm 0,02^*$	$0,27 \pm 0,02^*$
Опромінення + БАД	$0,23 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,04$
Cd	$0,22 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,03^*$
Cd + БАД	$0,24 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,04^*$
Гепатоцити		
Контроль	$0,28 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$
Опромінення	$0,34 \pm 0,02^*$	$0,24 \pm 0,01$
Опромінення + БАД	$0,29 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,02$
Cd	$0,23 \pm 0,02^*$	$0,20 \pm 0,03^*$
Cd + БАД	$0,26 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,01^*$

Примітка: * – $P < 0,05$ по відношенню до контролю.

За умов введення кадмію виявлено зменшення ступеню ексимеризації пірену, яке для СМЧ ентероцитів тонкої кишки становить у середньому 23% (N_{280}), а СМЧ гепатоцитів – 18% (N_{335}) та 20% (N_{280}), що свідчить про зростання мікров'язкості ліпідної фази. Введення БАД FLP-MD в умовах надходження кадмію не призводить до нормалізації мікров'язкості анулярних (прибілкових) ліпідів у препаратах СМЧ.

Отримані дані вказують на зміни структурної впорядкованості ліпідної компоненти мембран в умовах дії екзогенних чинників. В'язкість ліпідів, як відомо, є інтегральною величиною і залежить від

складу фосфоліпідів, вмісту холестеролу, який впорядковує структуру мембрани, кількості ненасичених жирних кислот, ступеню їх ненасиченості та від інтенсивності ПОЛ в мембранах тощо (Владимиров, Добрецов, 1980). Використання БАД FLP-MD в умовах опромінення нормалізує структурну впорядкованість (мікрів'язкість) ліпідної компоненти клітинних мембран, а при дії кадмію не впливає на структурну впорядкованість прибілкових ліпідів.

Інтенсивність триптофанової флуоресценції – один із основних спектральних показників, який характеризує конформаційний стан білкової молекули, оскільки максимуми флуоресценції окремих триптофанових залишків різняться залежно від їх розташування в білковій молекулі і відповідно від оточення (Демченко, 1988). В мембранних препаратах СМЧ ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів інтенсивність флуоресценції триптофанових залишків білкових молекул за умов опромінення знижується на 10 та 17% відповідно (табл. 3).

Таблиця 3.
Триптофанова флуоресценція білкових молекул внутрішньої мембрани мітохондрій за дії іонізуючої радіації, кадмію та БАД FLP-MD ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджу	Триптофанова флуоресценція, відн. од.	Частка доступних гасінню триптофанових залишків	Константа Штерна-Фольмера (K_{sv}), M^{-1}
Ентероцити тонкої кишки			
Контроль	1,0	0,92 ± 0,03	2,82 ± 0,15
Опромінення	0,90 ± 0,02*	0,84 ± 0,01*	3,41 ± 0,17*
Опромінення + БАД	0,98 ± 0,01	0,96 ± 0,03	3,08 ± 0,15
Cd	1,06 ± 0,02	0,96 ± 0,04	2,24 ± 0,13*
Cd + БАД	1,05 ± 0,03	0,91 ± 0,02	2,41 ± 0,16*
Гепатоцити			
Контроль	1,00	0,89 ± 0,03	3,58 ± 0,18
Опромінення	0,83 ± 0,03*	0,82 ± 0,01*	4,60 ± 0,17*
Опромінення + БАД	0,91 ± 0,03*	0,91 ± 0,03	3,23 ± 0,15
Cd	1,03 ± 0,02	0,90 ± 0,03	2,43 ± 0,16*
Cd + БАД	1,02 ± 0,02	0,88 ± 0,03	2,66 ± 0,18*

Примітка: * – $P < 0,05$ по відношенню до контролю.

Виявлені зміни можуть бути пов'язані як з конформаційними перебудовами білкових молекул, які супроводжуються переходом триптофанових залишків у більш гідрофільну область, так і з внутрішньо-молекулярною динамікою білків та характером взаємодії їх триптофанових залишків із сусідніми групами (Демченко, 1988). Результати дослідження гасіння триптофанової флуоресценції акриламідом свідчать, що за опромінення частка триптофанових залишків, які піддаються гасінню, зменшується для препаратів СМЧ ентероцитів та гепатоцитів на 16–18 %, а величина ефективної константи гасіння зростає на 21–28 % (табл. 3).

Відомо, що константа гасіння (Штерна-Фольмера, K_{sv}) відображає внутрішньо-молекулярну динаміку білкових молекул, а її зростання може бути обумовлено зменшенням структурної жорсткості мембранних білків (Демченко, 1988). Використання ліпосомальної форми БАД FLP-MD в умовах опромінення не призводить до змін досліджуваних показників відносно контрольних значень, що свідчить про стабілізацію структурно-динамічних властивостей мембранних білків (табл. 3).

За умов надходження кадмію інтенсивність триптофанової флуоресценції та частка триптофанових залишків, які піддаються гасінню, не змінюються відносно контролю. Однак, величина ефективної константи гасіння знижується для препаратів СМЧ ентероцитів та гепатоцитів у середньому на 21 та 32% відповідно. Використання ліпосомальної форми БАД FLP-MD на тлі надходження кадмію приводить до подібних змін, як і за окремого використання кадмію (табл. 3).

Отримані результати вказують на конформаційну модифікацію білків мітохондріальних мембран ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів в умовах дії екзогенних чинників. Введення тваринам ліпосомальної форми БАД FLP-MD перед опроміненням проявляє стабілізуючий вплив на структурно-динамічні властивості мембранних білків. Надходження кадмію призводить до зростання структурної жорсткості мембранних білків, ймовірно, внаслідок його взаємодії із сульфгідрильними групами, що призводить до утворення білок-білкових зшивок. Профілактичне введення ліпосомальної форми БАД FLP-MD в умовах надходження кадмію не призводить до нормалізації цього показника.

Висновки

Дослідження мембраностабілізуючих властивостей БАД FLP-MD проведено в експериментах *in vivo* за умов дії іонізуючої радіації чи кадмію. При цьому оцінювали структурний стан внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки та гепатоцитів. Результати проведених досліджень свідчать про ефективність застосування БАД FLP-MD для нормалізації структурного стану мембран, а саме: поверхневого шару, мікроязкості ліпідної компоненти, конформаційного стану білкових молекул, які піддалися змінам в умовах опромінення. В умовах надходження до організму кадмію введення БАД FLP-MD не призводить до повної нормалізації таких показників, як мікроязкість анулярних ліпідів та конформаційна рухливість білкових молекул мембран. Це необхідно враховувати в комплексному захисті організму від патогенного впливу кадмію.

Список літератури

- Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Горбунова Н.В. и др. Особенности биологического действия малых доз облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1996. – Т.36, №4. – С. 610–615. /Burlakova Ye.B., Goloshchapov A.N., Gorbunova N.V. i dr. Osobennosti biologicheskogo deystviya malykh doz oblucheniya // Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. – 1996. – Т.36, № 4. – С. 610–615./
- Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320с. /Vladimirov Yu.A., Dobretsov G.Ye. Fluorestsentyne zondy v issledovanii biologicheskikh membran. – М.: Nauka, 1980. – 320s./
- Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. – М.: Мир, 1997. – 624с. /Gennis R. Biomembrany: Molekulyarnaya struktura i funktsii. – М.: Mir, 1997. – 624s./
- Грищенко В.А., Хижняк С.В., Литвиненко О.М., Войціцький В.М. Структура мембран ентероцитів та гепатоцитів шурів за експериментальної ентеропатології та різних способів корекції // Ветеринарна медицина. – 2009. – №1. – С. 30–33. /Grishchenko V.A., Khyzhnyak S.V., Lytvynenko O.M., Voytits'kiy V.M. Struktura membran enterotsytiv ta hepatotsytiv shchuriv za eksperymental'noi enteropatologii ta riznykh sposobiv korektsii // Veterynarna medytsyna. – 2009. – №1. – С. 30–33./
- Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков. – К.: Наук. думка, 1988. – 280с. /Demchenko A.P. Lyuminestsentsiya i dinamika struktury belkov. – К.: Nauk. dumka, 1988. – 280s./
- Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. – М.: Наука, 1989. – 277с. /Dobretsov G.Ye. Fluorestsentyne zondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteidov. – М.: Nauka, 1989. – 277s./
- Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 424с. /Kucherenko M.Ye., Babenyuk Yu.D., Voytits'kiy V.M. Suchasni metody biokhimichnykh doslidzhen'. – К.: Fitosotsiotsentr, 2001. – 424s./
- Лактович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 236с. /Laktovich Dzh. Osnovy fluorestsentnoi spektroskopii. – М.: Mir, 1986. – 236s./
- Мельничук Д.О., Грищенко В.А. Ветеринарна біологічно активна добавка та спосіб репаративної терапії при диспепсії новонароджених телят. Пат. 78306 – Україна, 61К 35/20. №20041108957. Оpubл. 15.03.2007, Бюл. №3. /Mel'nychuk D.O., Gryshchenko V.A. Veterynarna biologichno aktyvna dobavka ta sposib reparatyvnoi terapii pry dyspepsii novonarodzhenykh telyat. Pat. 78306 – Ukraina, 61K 35/20. №20041108957. Opubl. 15.03.2007, Byul. №3./
- Практикум по биохимии / Под ред. Н.В.Северина, Л.Н.Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 389с. /Praktikum po biokhimii / Pod red. N.V.Severina, L.N.Solov'yevoy. – М.: Izd-vo MGU, 1989. – 389s./
- Хижняк С.В., Кисиль Е.А., Лапоша Е.А. и др. Влияние хронического ионизирующего облучения на структурные свойства апикальной и митохондриальной мембран энтероцитов тонкого кишечника // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т.46, №1. – С.27–33. /Khyzhnyak S.V., Kisil' Ye.A., Laposha Ye.A. i dr. Vliyaniye khronicheskogo ioniziruyushchego oblucheniya na strukturnyye svoystva apikal'noy i mitokhondrial'noy membran enterotsytov tonkogo kishechnika // Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. – 2006. – Т.46, №1. – С.27–33./
- Хижняк С.В. Клітинні механізми токсичності кадмію. – К.: Вид-во LAT&K, 2010. – 213с. /Khyzhnyak S.V. Klitynni mekhanizmy toksychnosti kadmiyu. – К.: Vyd-vo LAT&K, 2010. – 213s./
- Эйдус Л.Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз. – М.: Изд-во Ин-та теор. и эксперим. физики, 2001. – 81с. /Eydu L.Kh. Membranny mekhanizmy biologicheskogo deystviya malykh doz. – М.: Izd-vo In-ta teor. i eksper. fiziki, 2001. – 81s./
- Lowry O.H., Rosenbouch N.J., Fair A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265–275.

Представлено: М.О.Дружина / Presented by: М.О.Дружина

Рецензент: В.А.Бондаренко / Reviewer: V.A.Bondarenko

Подано до редакції / Received: 27.01.2011