

ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ МІТОХОНДРІЙ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ ТА ГЕПАТОЦИТІВ ЗА ДІЇ НА ОРГАНІЗМ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ЛІПОСОМ

В. А. Грищенко, В. А. Томчук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Значну радіочутливість виявляють ентероцити та гепатоцити. Кінцевий прояв реакцій клітинних мембран на дію іонізуючої радіації залежить від особливостей їхньої структури. Фосфоліпідний склад біомембран є важливою структурно-функціональною характеристикою будь-яких клітин. Встановлено ефективність використання ліпосомальної форми біологічно активної добавки FLP-MD на основі фосфоліпідів молока для відновлення фосфоліпідного складу внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки та гепатоцитів в умовах дії на організм щурів іонізуючої радіації.

Ключові слова: ФОСФОЛІПІДИ, ІОНІЗУЮЧА РАДІАЦІЯ, ВНУТРІШНЯ МЕМБРАНИ МІТОХОНДРІЙ, ЕНТЕРОЦИТИ, ГЕПАТОЦИТИ, ЛІПОСОМИ, ЩУРИ

Різноманітні зворотні й незворотні зміни клітин і тканин базуються на послідовності радіаційно-індукованої відповіді мембран, показники якої можуть виступати біоіндикаторами дії іонізуючих випромінювань [1, 2]. Кінцевий прояв реакцій біомембран на дію іонізуючої радіації залежить від особливостей їхньої структури і середовища оточення [3].

Одним із найрадіочутливіших органів, зміни функцій якого є найбільш глибокими та стійкими, є тонка кишка, зв'язуюча ланка між організмом і зовнішнім середовищем [4]. Значною мірою це визначається високоспеціалізованою структурою епітеліальних клітин – ентероцитів. Значну радіочутливість виявляють також гепатоцити, до яких надходять субстрати після трансформації та всмоктування у кишечнику.

Відомо, що ранні порушення клітин при дії негативних факторів, можуть бути пов'язані з пошкодженням мітохондрій [5]. Вони раніше інших органел піддаються структурно-функціональним змінам. Порушення функціонування цих органел може бути одним із визначальних механізмів, за якими реалізується уражувачий ефект різних факторів [6]. Фосфоліпідний (ФЛ) склад біомембран є важливою структурно-функціональною характеристикою будь-яких клітинах, у т. ч. епітеліоцитів кишечника та печінки [7]. Тому *метою роботи* було дослідити вплив іонізуючої радіації на якісні та кількісні характеристики ФЛ-складу внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів і можливість їхнього коригування шляхом застосування ліпосом на основі ФЛ молока.

Матеріали і методи

Дослідження були проведені на безпородних щурах-самцях масою тіла 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин-аналогів розділяли на групи по 7 голів у кожній. У контрольній групі знаходились інтактні тварини; у першій – тварин тотально однократно опромінювали рентгенівськими променями в дозі 2,0 Гр; у другій – тваринам перорально вводили 1 % розчин ліпосомальної форми біологічно активної добавки (БАД) FLP-MD на основі ФЛ молока [8] (13,5 мг/кг) упродовж 5 діб, а потім піддавали рентгенівському опроміненню в дозі 2,0 Гр. Щурів декапітували через 2 доби під етерним наркозом. Опромінення проводили на установці РУМ-17 з тубусом за наступних умов: потужність дози 0,17 Гр/хв, фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, сила струму 10 мА, напруга 200 кВ, шкіро-фокусна відстань 50 см.

Мітохондрії епітеліоцитів слизової оболонки тонкої кишки (СОТК) та печінки отримували методом диференційного центрифугування, а після заморожування-відтаювання цієї фракції та при подальшому її центрифугуванні при 25 000 g упродовж 30 хв отримували осад, до складу якого входили субмітохондріальні частинки (СМЧ) – обернена назовні внутрішня мембрана мітохондрій [9]. Вміст протеїну в одержаних препаратах визначали методом Лоурі.

Фосфоліпіди розділяли методом двовимірної тонкошарової хроматографії [10] на стандартних платівках фірми «Сорбфіл» (Росія) в системі розчинників: хлороформ–метанол–бензол–аміак (65 : 35 : 10 : 6) та хлороформ–метанол–бензол–оцтова кислота–дистильована вода–ацетон (70 : 30 : 10 : 5 : 1 : 4). Вміст індивідуальних ФЛ визначали за кількістю неорганічного фосфору із застосуванням молібдатного реактиву. Індивідуальні ФЛ ідентифікували за допомогою специфічних реакцій та маркерів, а їхній вміст вимірювали на спектрофотометрі Specol-II фірми «Analytik Jena» (Німеччина) при λ 830 нм.

Результати експериментальних досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [11]. Зміни показників вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати й обговорення

У досліджуваних препаратах СМЧ мембран виявлено всі основні фракції ФЛ (табл.).

Таблиця

Вміст індивідуальних фосфоліпідів у препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки та гепатоцитів (мкг/мг протеїну) за дії іонізуючої радіації та при застосуванні ліпосомальної форми БАД FLP-MD

($M \pm m$, $n=7$)

Фосфоліпід	Контроль	Перша група	Друга група
<i>Ентероцити слизової оболонки тонкої кишки</i>			
ФХ	117,88 $\pm$ 10,01	108,84 $\pm$ 10,22	109,25 $\pm$ 9,99
ФЕ	77,85 $\pm$ 6,09	56,09 $\pm$ 6,00*	68,76 $\pm$ 6,54
СМ	16,68 $\pm$ 1,71	27,38 $\pm$ 2,65*	38,89 $\pm$ 3,34*
ФС+ФІ	23,35 $\pm$ 2,00	18,70 $\pm$ 1,45	38,19 $\pm$ 3,23*
КЛ	38,92 $\pm$ 3,54	34,72 $\pm$ 3,34	36,53 $\pm$ 4,11
ЛФХ	–	Сліди	Сліди
ЛФЕ	–	Сліди	–
<i>Гепатоцити</i>			
ФХ	176,34 $\pm$ 11,56	126,06 $\pm$ 11,01*	229,32 $\pm$ 21,23*
ФЕ	89,04 $\pm$ 8,27	59,64 $\pm$ 5,20*	125,98 $\pm$ 11,76*
СМ	21,76 $\pm$ 1,67	34,72 $\pm$ 3,28*	33,72 $\pm$ 1,49*
ФС+ФІ	24,36 $\pm$ 2,61	18,12 $\pm$ 1,29*	35,52 $\pm$ 3,32*
КЛ	58,04 $\pm$ 5,31	47,56 $\pm$ 4,34*	62,36 $\pm$ 8,47
ЛФХ	–	Сліди	–
ЛФЕ	–	Сліди	–

Примітка: ФХ – фосфатидилхолін; ФЕ – фосфатидилетаноламін; СМ – сфінгомієлін; ФІ – фосфатидилінозитол; ФС – фосфатидилсерин; КЛ – кардіоліпін; ЛФХ – лізофосфатидилхолін; ЛФЕ – лізофосфатидилетаноламін. * $p < 0,05$ відносно контролю.

Отримані результати свідчать, що найбільш представлені серед індивідуальних ФЛ у СМЧ мембран ентероцитів і гепатоцитів у піддослідних щурів – фосфатидилхолін (ФХ) та фосфатидилетаноламін (ФЕ). Вміст сфінгомієліну (СМ), фосфатидилінозиту (ФІ) та фосфатидилсерину (ФС) значно нижчий. Для внутрішньої мембрани мітохондрій характерною є наявність кардіоліпіну (КЛ). Зазначені ФЛ беруть участь у регуляції активності ферментів дихального ланцюга, транспорті йонів тощо [7]. У контрольних препаратах в умовах дослідження не виявлено лізоформ ФЛ: лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) та лізофосфатидилетаноламіну (ЛФЕ).

Для препаратів СМЧ ентероцитів СОТК в умовах опромінення характерним є зменшення вмісту ФЕ на 28 % та підвищення рівня СМ на 64 %. Введення ліпосомальної форми БАД FLP-MD призводить до відновлення рівня досліджуваних показників і навіть зростання вмісту таких ліпідних фракцій, як СМ (у 2,3 раза) і сумарної фракції (ФС+ФІ) на 63,6 % відносно контролю. Відновлення ліпідного складу клітинних мембран при використанні ліпосомальної форми БАД FLP-MD показано й при інших патологіях [12, 13].

У препаратах СМЧ мембран гепатоцитів за умов опромінення характерним є зменшення вмісту основних класів ФЛ (ФХ у середньому на 29 та ФЕ на 33 %) та сумарної фракції ФС+ФІ – на 25,6 і КЛ – на 18 %, а також збільшення вмісту СМ на 59 %. Використання опроміненим тваринам ліпосомальної форми БАД FLP-MD призводить до підвищення рівня більшості досліджуваних ФЛ у СМЧ мембран гепатоцитів порівняно із контрольними значеннями (див. табл.).

Висновки

Застосування щурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD на основі ФЛ молока сприяє відновленню кількісних характеристик ФЛ-складу внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки та гепатоцитів в умовах дії на організм іонізуючої радіації. Такий ефект дії ліпосомальної форми БАД FLP-MD на досліджувані показники, ймовірно, зумовлений стабілізацією мембранних структур за рахунок подібності ФЛ-складу біодобавки з мембранними структурами ссавців [8] та захисту від пероксидного окиснення ФЛ клітинних мембран зважаючи на встановлений нами раніше антиоксидантний ефект дії її компонентів за умов впливу на організм іонізуючої радіації [14].

Перспективи подальших досліджень. Зміни ФЛ-складу внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки та гепатоцитів в умовах дії на організм іонізуючої радіації безперечно будуть впливати на її фізичні та структурно-динамічні характеристики. Тому, на перспективу планується вивчити якісні та кількісні характеристики цих показників і можливість коригування їхніх змін шляхом використання ліпосомальної форми БАД FLP-MD на основі ФЛ молока.

V. A. Grishchenko, V. A. Tomchuk

PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF INTERNAL MEMBRANE OF MITOCHONDRIA IN ENTEROCYTES OF SMALL INTESTINE AND HEPATOCYTES UNDER EFFECT OF IONIZING RADIATION ON ORGANISM AND LIPOSOME USE

S u m m a r y

Enterocytes and hepatocytes are shown the significant radio-sensibility. Final display of reactions of cellular membranes on effect of ionizing radiation depends on peculiarities of their structure. Phospholipid composition of bio-membranes is an important structural and functional characteristic of any cells. It has been established the effectiveness of use of liposomal form of biological active additive FLP-MD on base milk phospholipids for recovery of phospholipid composition of internal membrane of mitochondria in enterocytes of mucosal shell of small intestine and in hepatocytes under conditions of ionization radiation effect on organism of rat.

В. А. Грищенко, В. А. Томчук

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ЭНТЕРОЦИТОВ ТОНКОЙ КИШКИ И ГЕПАТОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НА ОРГАНИЗМ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОСОМ

А н н о т а ц и я

Значительную радиочувствительность обнаруживают энтероциты и гепатиоциты. Заключительное проявление реакций клеточных мембран на действие ионизирующей радиации зависит от особенностей их структуры. Фосфолипидный состав биомембран является важной структурно-функциональной характеристикой любых клеток. Установлена эффективность использования липосомальной формы биологически активной добавки FLP-MD на основе фосфолипидов молока для восстановления фосфолипидного состава внутренней мембраны митохондрий энтероцитов слизистой оболочки тонкой кишки и гепатоцитов в условиях действия на организм крыс ионизирующей радиации.

1. *Кучеренко М. Є.* Радіаційно-індукована структурно-метаболическа модифікація ентероцитів та лімфоїдних клітин / Кучеренко М. Є., Войціцький В. М., Хижняк С. В. та ін. ; під заг. ред. акад. НАН України М. Є. Кучеренка. – К. : Фітосоціоцентр, 2006. – 202 с.
2. *Benderitter M.* Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure / M. Benderitter, L. Vincent-Genod, A. Berroud [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – V. 75 – P. 1043–1053.
3. *Гродзинський Д. М.* Радіобіологія / Гродзинський Д. М. – К. : Либідь, 2000. – 448 с.
4. *Кучеренко М. Є.* Ентероцити тонкої кишки та радіація / Кучеренко М. Є., Хижняк С. В., Вексларський Р. З. та ін. – К. : Фітосоціоцентр, 2003. – 176 с.
5. *Zamzami N.* Apoptosis and necrosis / N. Zamzami, P. Marchetti, M. Castedo // *Exp. Med.* – 1995. – V. 181. – P. 1661–1672.
6. *Жукова А. А.* Влияние высоких доз γ -радиации на энергетику митохондрий печени крыс / А. А. Жукова, В. Г. Гогвадзе // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 1997. – Т. 37, № 3. – С. 382–386.
7. *Гула Н. М.* Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах / Н. М. Гула, В. М. Маргітич. – К. : Наукова думка, 2009. – 335 с.
8. Пат. 86516 Україна, МПК А 61К 35/20 А 23К 1/00. Ветеринарна біологічно активна добавка ліпосомальної форми та спосіб репаративної терапії в гепатології / Мельничук Д. О., Грищенко В. А., Литвиненко О. М.; заявник і патентовласник НУБіП України. – № а 200710252 ; заявл. 14.09.2007 ; опубл. 27.04.2009, Бюл. № 8.
9. *Северин Н. В.* Практикум по биохимии / Под ред. Н. В. Северина, Л. Н. Соловьева – М. : Из-во МГУ, 1989. – 389 с.
10. *Vaskovsky V. E.* A universal reagent for phospholipids analysis / V. E. Vaskovsky // *J. Chromatogr.* – 1975. – 114, № 1. – P. 123–141.

11. *Кучеренко М. Є.* Сучасні методи біохімічних досліджень / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войціцький. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 412 с.
12. *Литвиненко О. М.* Дослідження дії добавки БАД FLP-MD на фосфоліпіди мембран гепатоцитів / О. М. Литвиненко, Л. І. Степанова, В. А. Грищенко [та ін.] // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2008. – Вип. 52. – С. 10–12.
13. *Степанова Л. І.* Фосфоліпідний склад мембран ентероцитів при дії добавки БАД FLP-MD / Л. І. Степанова, В. А. Грищенко, З. И. Реброва // Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2007. – Вип. 12. – С. 24–26.
14. *Хижняк С. В.* Активність ферментів антиоксидантного захисту за дії іонізуючого випромінювання та фосфоліпидовмісного препарату / Хижняк С. В., Грищенко В. А., Степанова Л. І. [та ін.] // Фізика живого. – 2008. – 16, № 2. – С. 65–69.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення овець і вовноутворення, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Стапай П. В.