

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ МЕМБРАН МІТОХОНДРІЙ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ ЗА ДІЇ КАДМІЮ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ЛІПОСОМ

В. А. Грищенко¹, В. А. Томчук¹, С. В. Хижняк²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Токсична дія Кадмію пов'язана з його впливом на структурний стан клітинних мембран, що викликає порушення у структурі та функціонуванні клітин в цілому. Результати дослідження вказують на конформаційну модифікацію білків мембран мітохондрій ентероцитів тонкої кишки при надходженні в організм щурів іонів кадмію. Профілактичне введення щурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD на основі фосфоліпідів молока сприяє відновленню поверхневої структури внутрішньомітохондріальної мембрани ентероцитів тонкої кишки, проте не призводить до повної нормалізації таких показників, як мікров'язкість анулярних ліпідів та конформаційна рухливість білкових молекул цієї мембрани. Це слід враховувати при проведенні комплексного захисту організму від патогенного впливу Кадмію.

Ключові слова: СТРУКТУРНИЙ СТАН, КАДМІЙ, ВНУТРІШНЯ МЕМБРАНА МІТОХОНДРІЙ, ЕНТЕРОЦИТИ, ФОСФОЛІПІДИ МОЛОКА, ЛІПОСОМИ, ЩУРИ

Загальновідомо, що біологічні мембрани є тією клітинною структурою, зміни й пошкодження якої викликають порушення у структурі та функціонуванні клітини в цілому [1]. Токсична дія Кадмію пов'язана з його впливом на структурний стан клітинних мембран. Вибіркова дія Кадмію на мембранозв'язані ферменти, транспортні системи, рецепторні комплекси опосередковується переважно через його взаємодію з SH-групами білків [2].

Флуоресцентними методами вже досліджено вплив Кадмію на структуру мембран мікосом гепатоцитів. Показано, що цей метал з'єднується з негативно зарядженими групами мембран і таким чином модифікує заряд їхньої поверхні. Одночасно реєструється суттєве збільшення мікров'язкості ліпідної фази мембрани без зміни її полярності. Таку ситуацію автори пов'язують з тим, що Кадмій «зшиває» поряд розташовані негативно заряджені групи фосфоліпідів і, таким чином, обмежує їхню рухливість [3].

Тому при надходженні в організм іонів Кадмію, важливого значення набувають препарати мембранотропної та репаративної дії, до яких відноситься і розроблена на кафедрі біохімії тварин, якості і безпеки сільськогосподарської продукції імені акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України ліпосомальна форма біологічно активної добавки (БАД) FLP-MD на основі фосфоліпідів молока [4]

Метою нашої роботи було дослідити структурний стан внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки при введенні в організм щурів кадмію хлориду та при застосуванні ліпосомальної форми БАД FLP-MD.

Матеріали і методи

Дослідження провели на безпородних щурах-самцях масою тіла 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин-аналогів розділяли на групи по 5 голів у кожній. У першій групі знаходились контрольні тварини; тваринам другої групи упродовж 14 діб перорально вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла, що відповідає 1/50 ЛД₅₀; а тваринам третьої групи вводили 1 % розчин ліпосомальної форми БАД FLP-MD у дозі 13,5 мг/кг маси тіла впродовж 5 діб, а потім, на тлі застосування біодобавки, вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла (впродовж 14 діб). Після закінчення експерименту щурів декапітували.

Мітохондрії епітеліоцитів отримували методом диференційного центрифугування, а після заморожування-відтаювання цієї фракції та при подальшому її центрифугуванні при 25000 g упродовж 30 хв отримували осад, до складу якого входили субмітохондріальні частинки (СМЧ) — обернена назовні внутрішня мембрана мітохондрій [5].

Структурний стан мітохондріальної мембрани оцінювали за допомогою флуоресцентних зондів [6, 7], які локалізуються в різних ділянках мембрани: 1-анілінонафталін-8-сульфонат (АНС) — в основному на поверхні мембранного бішару, пірен — в зоні жирнокислотних ланцюгів ФЛ [8]. Крім того, вимірювали триптофанову флуоресценцію білкових молекул [9] та визначали ефективність індуктивно резонансного перенесення енергії (ІРПЕ) в донорно-акцепторних парах різної локалізації в мембрані (пірен–АНС) [10].

При взаємодії з мембраною від'ємно заряджена молекула АНС не може занурюватись глибоко в ліпідну фазу, а локалізується на межі ліпід–вода в області гліцеролових залишків. Оскільки, майже вся вимірювана флуоресценція АНС зумовлена тільки флуоресценцією зв'язаного зонду, це надає можливість за даними флуоресценції визначати параметри його зв'язування з мембраною: константу зв'язування (КАНС) і кількість місць зв'язування (НАНС).

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

Результати й обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено незначні зміни інтенсивності флуоресценції АНС при зв'язуванні з мембранними препаратами мітохондрій ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки в умовах надходження Кадмію в організм щурів (табл. 1). Це може бути зумовлено змінами параметрів зв'язування зонду з мембранами. Показник $N_{\text{АНС}}$ вірогідно зменшується на 18 % під впливом Кадмію відносно контрольних значень. При застосуванні ліпосомальної форми БАД FLP-MD спостерігається відновлення величини досліджуваного показника. Слід відмітити, що при окремому застосуванні ліпосомальна форма БАД FLP-MD не впливає на показники структурного стану клітинних мембран (дані не наведено).

Таблиця 1

Спектральні характеристики флуоресцентного зонду АНС, зв'язаного з внутрішньою мембраною мітохондрій ентероцитів тонкої кишки щурів, за експериментальних умов ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджу	Інтенсив. F, від.од.	Константа зв'язування, мкМ^{-1}	Кількість місць зв'язування, нмоль / мг білка
Контроль	1,0	$21,0 \pm 0,8$	$10,7 \pm 0,4$
Cd	$1,06 \pm 0,02$	$19,1 \pm 0,8$	$8,8 \pm 0,6^*$
Cd+БАД FLP-MD	$1,0 \pm 0,03$	$21,0 \pm 1,0$	$9,8 \pm 0,4$

Примітка: у цій та наступних таблицях * — $p < 0,05$ відносно контролю

Зміни кількості місць зв'язування АНС з мембраною є відображенням інтегральних процесів (зміни мікрооточення зонду, поверхневого заряду, структурних перебудов тощо), які протікають у мембрані при дії різноманітних чинників, враховуючи, що флуоресценція АНС визначається його складом [12]. Молекула АНС локалізується в полярній зоні мембрани, утворюючи комплекси з білковими та ліпідними компонентами. Результати вивчення взаємодії флуоресцентного зонду АНС з мембранами можуть свідчити про зміну поверхневої структури мембрани в умовах надходження в організм тварин Кадмію, що може бути зумовлене модифікацією як ліпідного компонента в зоні полярних голівок гліцеролових залишків фосфоліпідів, так і мембранних білків. Застосування щурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD сприяє відновленню досліджуваних характеристик мембран.

За умов уведення шурам Кадмію виявлено зменшення ступеня ексімеризації пірену в препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки (у середньому на 23 %, N_{280}), що свідчить про зростання мікрів'язкості її ліпідної фази (табл. 2). Введення ліпосомальної форми БАД FLP-MD в організм тварин за умов надходження Кадмію не призводить до відновлення мікрів'язкості анулярних ліпідів у препаратах СМЧ мембран.

Отримані дані вказують на зміни структурної впорядкованості ліпідного компонента мембран ентероцитів за умов надходження в організм Кадмію. В'язкість ліпідів, як відомо, є інтегральною величиною і залежить від складу фосфоліпідів, вмісту холестеролу, який впорядковує структуру мембрани, рівня ненасичених жирних кислот, ступеня їхньої ненасиченості та від інтенсивності протікання пероксидного окиснення ліпідів у мембранах тощо [13].

Таблиця 2

Ступінь ексімеризації пірену в препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки для загальної ліпідної фази (N_{335}) та анулярних ліпідів (N_{280}) за експериментальних умов ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджу	N_{335} , відн.од.	N_{280} , відн.од.
Контроль	$0,27 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,01$
Cd	$0,22 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,03^*$
Cd+БАД FLP-MD	$0,24 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,04^*$

Емісійний спектр триптофанової флуоресценції мембранних білків для СМЧ мембран ентероцитів тонкої кишки подібний за всіх умов досліджу за $\lambda_{\text{макс}} = 340$ нм (табл. 3). Гасниками власної флуоресценції можуть бути розташовані поряд із триптофановими хромофорами власні білкові групи: карбонільні групи пептидного зв'язку, бокові кінцеві карбоксильні та аміногрупи, дисульфідні групи та імідазол гістидину [14].

Аналіз даних щодо гасіння триптофанової флуоресценції мембранних препаратів при використанні модифікованого графіка Штерна-Фольмера свідчить, що акриламід у середньому на 90 % гасить триптофанову флуоресценцію в мембранах мітохондрій ентероцитів.

Таблиця 3

Триптофанова флуоресценція білкових молекул у препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій ентероцитів тонкої кишки за експериментальних умов ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджу	Триптофанова флуоресценція, відн.од.	Частка доступних гасінню триптофанових залишків	Константа Штерна-Фольмера (K_{SV}), M^{-1}
Контроль	1,0	$0,92 \pm 0,03$	$2,82 \pm 0,15$
Cd	$1,06 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,04$	$2,24 \pm 0,13^*$
Cd+БАД FLP-MD	$1,05 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,02$	$2,41 \pm 0,16^*$

Відомо, що зміна константи гасіння (константа Штерна-Фольмера, K_{SV}) відображає внутрішньо-молекулярну динаміку білкових молекул [14]. Необхідно відзначити, що зростання ефективності гасіння триптофанової флуоресценції, про що свідчить K_{SV} , може бути зумовлено зменшенням структурної жорсткості мембранних білків [15].

Аналіз даних щодо гасіння триптофанової флуоресценції мембранних препаратів за умов дії Кадмію проведено при використанні модифікованого графіка Штерна-Фольмера (табл. 3).

За умов надходження Кадмію в організм щурів інтенсивність триптофанової флуоресценції та частка триптофанових залишків, які піддаються гасінню, не змінюється відносно контролю. Однак, величина ефективної константи гасіння знижується для мембранних препаратів мітохондрій ентероцитів у середньому на 21 %. Використання ліпосомальної форми БАД FLP-MD на тлі надходження Кадмію призводить до подібних змін як і при окремому використанні металу.

Висновки

Отримані результати вказують на конформаційну модифікацію білків мембран мітохондрій ентероцитів тонкої кишки при надходженні в організм щурів іонів Кадмію. Профілактичне введення щурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD на основі фосфоліпідів молока сприяє відновленню поверхневої структури внутрішньомітохондріальної мембрани ентероцитів тонкої кишки, але не призводить до повної нормалізації таких показників, як мікров'язкість анулярних ліпідів та конформаційна рухливість білкових молекул цієї мембрани. Описане слід враховувати при проведенні комплексного захисту організму від патогенного впливу Кадмію.

Перспективи подальших досліджень. Планується вивчити можливість коригування показників структурної організації внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів за умов надходження в організм щурів Кадмію.

V. A. Gryshchenko, V. A. Tomchuk, S. V. Khyzhnyak

STRUCTURAL CHANGES OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE OF ENTEROCYTES IN THE SMALL INTESTINE UNDER THE CADMIUM EFFECT AND THE APPLICATION OF LIPOSOMES

S u m m a r y

Toxic effect of Cadmium is related to its action on structural state of cellular membranes which causes a disturbance in the structure and functioning of cells in general. The results of investigation indicate conformational modification of proteins in mitochondrial membranes of enterocytes in the small intestine when ions of cadmium were coming to inside of rat organism. Prophylactic injection of liposomal form of biologically active supplements FLP-MD based on phospholipids of milk helps to restore the surface structure of the internal mitochondrial membrane of enterocytes in the small intestine but it doesn't cause full normalization of such indices as micro-viscosity of annular lipids and conformational mobility of protein molecules in the membrane. This should be considered during the complex protection of the organism from pathogenic effects of Cadmium.

B. A. Грищенко, В. А. Томчук, С. В. Хижняк

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ТОНКОЙ КИШКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КАДМИЯ И ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЛИПОСОМ

А н н о т а ц и я

Токсическое действие кадмия связано с его влиянием на структурное состояние клеточных мембран, что вызывает нарушение структуры и функционирование клеток в целом. Результаты исследования указывают на конформационную модификацию белков мембран митохондрий энтероцитов тонкой кишки при поступлении в организм крыс ионов кадмия. Профилактическое введение крысам липосомальной формы БАД FLP-MD на основе фосфолипидов молока способствует восстановлению поверхностной структуры внутримитохондриальных мембран энтероцитов тонкой кишки, однако не приводит к полной нормализации таких показателей, как микровязкость анулярных липидов и конформационная подвижность белковых молекул этой мембрани. Это следует учитывать в проведении комплексной защиты организма от патогенного влияния кадмия.

1. Эйдус Л. Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз / Л. Х. Эйдус. — М. : Изд-во Ин-та теор. и exper. физики, 2001. — 81 с.

2. Хижняк С. В. Клітинні механізми токсичності кадмію / С. В. Хижняк. — К. : LAT & K, 2010. — 213 с.

3. *Klein D.* Stability of metallothionein in gastric juice / D. Klein // *Toxicology*. — 1986. — V. 41, № 2. — P. 121–129.
4. Пат. 86516 Україна, МПК А 61К 35/20 А 23К 1/00. Ветеринарна біологічно активна добавка ліпосомальної форми та спосіб репаративної терапії в гепатології / Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко, О. М. Литвиненко ; заявник і патентовласник НУБіП України. — № а 200710252 ; заявл. 14.09.2007 ; опубл. 27.04.2009. — Бюл. № 8.
5. *Северин Н. В.* Практикум по биохимии / Под ред. Н. В. Северина, Л. Н. Соловьева. — М. : Из-во МГУ, 1989. — 389 с.
6. *Хижняк С. В.* Сравнительное изучение физических свойств апикальной и базолатеральной мембран энтероцитов тонкого кишечника после воздействия ионизирующей радиации / С. В. Хижняк // *Укр. биохим. журнал*. — 1998. — Т. 70, № 1. — С. 44–48.
7. *Хижняк С. В.* Використання флуоресцентних зондів для оцінки розмірів апікальної мембрани ентероцитів після дії іонізуючої радіації / С. В. Хижняк, Л. І. Степанова, І. І. Ромась та ін. // *Укр. радіол. журнал*. — 1998. — Т. 6, № 2. — С. 209–211.
8. *Владимиров Ю. А.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю. А. Владимиров, Г. Е. Добрецов. — М. : Наука, 1980. — 320 с.
9. *Лактович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лактович. — М. : Мир, 1986. — 236 с.
10. *Фоменко Б. С.* Индуктивно-резонансный перенос энергии между хромофорами, локализованными в разных участках облученных и необлученных теней эритроцитов / Б. С. Фоменко, Г. К. Длимбетова, И. Г. Акоев // *Радиобиология*. — 1985. — Т. XXV, № 1. — С. 12–15.
11. *Кучеренко М. Є.* Сучасні методи біохімічних досліджень / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войцицький. — К. : Фітосоціоцентр, 2001. — 412 с.
12. *Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов / Г. Е. Добрецов. — М. : Наука, 1989. — 277 с.
13. *Рыскулова С. Т.* Радиационная биология плазматических мембран / С. Т. Рыскулова. — М. : Энергоатомиздат, 1986. — 128 с.
14. *Демченко А. П.* Люминесценция и динамика структуры белков / А. П. Демченко. — К. : Наук. думка, 1988. — 280 с.
15. *Хижняк С. В.* Вплив сублетальних доз іонізуючої радіації на структурно-динамічні властивості білкових молекул апікальної мембрани ентероцитів / С. В. Хижняк, І. В. Ващенко, А. А. Бублик та ін. // *Вісник Київського університету імені Тараса Шевченка. Біологія*. — 1999. — Вип. 29. — С. 21–23.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Стапай П. В.