

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 577.15.03.04

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ПИРЕНА И 1,8-АНИЛИНОНАФТАЛИНСУЛЬФОНАТА МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ И АЛИМЕНТАРНЫХ ФАКТОРОВ**В.Н. Ткаченко, Ю.В. Никитченко, В.В. Товстяк, Г.П. Горбенко, О.Т. Николов***Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина.*

61077, г. Харьков. пл. Свободы 4

Поступила в редакцию 20 августа 2003 г.

В работе исследовано совместное влияние однократного гамма-облучения (доза 8 Гр), несбалансированного (по животным белкам и витаминам антиоксидантного ряда) рациона и пищевой добавки (аронии черноплодной) на интенсивность флуоресценции (мономеров и эксимеров) пирена, 1,8-анилинонафталинсульфоната (1,8-АНС), интенсивность аскорбат – Fe^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) и на содержание гидроперекисей липидов в микросомах печени крыс. Установлено, что гамма-облучение животных, получавших несбалансированный рацион питания, приводит к более выраженной активации ПОЛ и перестройке микросомальных мембран, сопровождающейся снижением количества отрицательно заряженных групп на поверхности мембран микросом, чем облучение крыс, содержащихся на стационарном рационе вивария. Пищевая добавка аронии черноплодной нивелировала активацию ПОЛ и изменения распределения заряженных групп на поверхности мембран микросом печени облученных крыс, получавших несбалансированный рацион питания. Полученные данные позволяют заключить, что пищевая добавка аронии черноплодной обладает антиоксидантным и мембранопротекторным действием и может коррегировать нарушения детоксикационной способности микросом печени облученного организма и, особенно, облученных животных, получавших несбалансированное питание.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микросомы печени крыс, гамма-облучение, алиментарные факторы, перекисное окисление липидов, аскорбат – Fe^{2+} -индуцированное перекисное окисление липидов, флуоресцентные зонды, пирен, 1,8-АНС

Известно, что в развитии процессов радиационного повреждения клеток важную роль играют структурные изменения биологических мембран. Модификация структуры биомембран при воздействии радиации может определяться множеством факторов - окислением сульфгидрильных групп, конформационными перестройками белковых молекул, перекисным окислением липидов (ПОЛ), изменением физических свойств липидного бислоя и т.д. [1,2].

В настоящее время стало очевидным, что при действии радиации одним из основных модифицирующих факторов липидного бислоя мембраны и ее функции в целом является развитие процессов ПОЛ [2,3]. В связи с этим степень радиационного повреждения мембранного аппарата клетки может в значительной степени зависеть от состояния антиоксидантной системы организма. Имеются данные, что у населения, проживающего в районах с экологически неблагоприятной обстановкой, и в частности, на территориях, прилегающих к Чернобыльской АЭС, наблюдается дефицит витаминов антиоксидантного ряда А, С, Е и β -каротина [4]. С другой стороны, показано, что при применении сбалансированного рациона питания и особенно, при использовании биологически активных добавок, устойчивость организма к неблагоприятным факторам окружающей среды, в том числе, к воздействию ионизирующей радиации может увеличиваться [4-6].

Целью настоящей работы явилось исследование совместного влияния однократного гамма-облучения, несбалансированной (по животным белкам и витаминам антиоксидантного ряда) диеты и пищевой добавки (аронии черноплодной) на интенсивность свободнорадикального ПОЛ и флуоресценцию 1,8-АНС и пирена в микросомах печени крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 60 крыс-самцов линии Вистар, массой 160 г, которые были разбиты на 6 групп, по 10 животных в каждой. 1-я и 2-я группы получали в течение 50 дней общепринятый рацион вивария, дополненный водорастворимыми витаминами А, В₁, В₂ и С (0.10, 0.01, 0.02 и 0.70 мг/100 г массы крыс соответственно). В 3-й - 6-й группах животных из рациона исключали добавку всех водорастворимых витаминов, растительное масло проваривали при 180°С 3 часа, а зерновую смесь при 100°С 1 час. Мясную добавку в рационе животных 3-й - 6-й групп заменяли такой же по количеству добавкой проваренного зерна. Несбалансированная по белкам мяса и витаминам диета в 3-й - 6-й

группах крыс применялась в течение 50 дней. 5-я и 6-я группы животных на фоне несбалансированной диеты с 30-го дня эксперимента в течение 20 дней получали пищевую добавку муки *Aronia melanocarpa* (4 г/100 г массы крыс).

После 50 дней применения выше описанных рационов животных 2-й, 4-й и 6-й групп однократно облучали источником γ -излучения Co^{60} на установке закрытого типа «Исследователь», (мощность экспозиционной дозы составляла 195 Рентген/мин) и через 24 часа брали в опыт.

После декапитации крыс печень быстро извлекали и охлаждали 3-5 мин в среде выделения (СВ), содержащей: 0.3 М сахарозы, 1мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСI буфер рН 7.4. Охлажденную смесь продавливали через пресс и гомогенизировали (стекло-тефлон) в СВ в соотношении 1:7 (ткань:СВ).

Микросомы печени крыс получали методом дифференциального центрифугирования как описано в [7]. Полученный осадок микросом суспендировали в 0.5 мл среды, содержащей 125 мМ КСI, 20 мМ трис-НСI буфер, рН 7.4 и хранили на холоду до использования в опыте.

Структурное состояние мембран микросом исследовали с помощью флуоресцентных зондов 1,8-АНС и пирена [8]. Спектры флуоресценции пирена регистрировали на спектрофлуориметре СМ 2203 при длине волны возбуждения 337 нм в 100 мМ трис-НСI-буфере рН 7.4, содержащем 0.25 мг белка микросом в 1 мл и 2.4 мкМ зонда. Типичные спектры флуоресценции пирена в микросомах печени интактных и облученных животных показаны на Рис. 1.

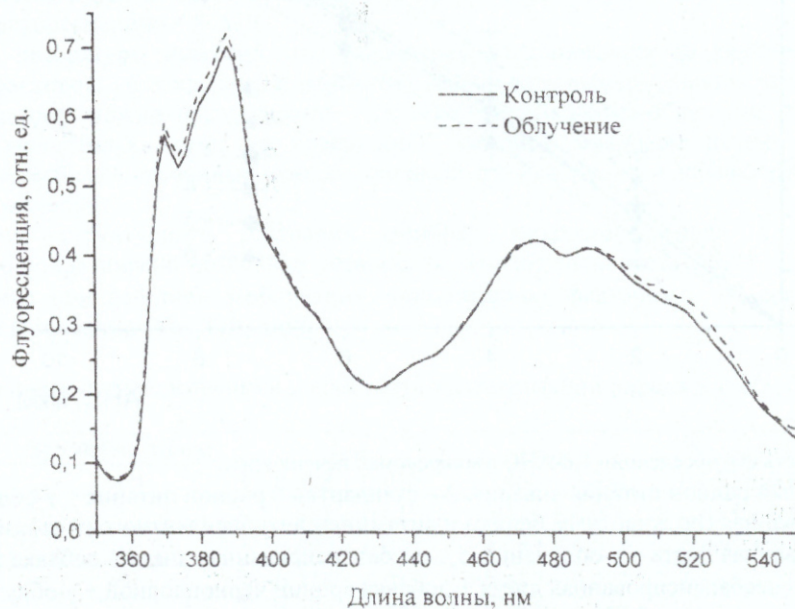


Рис. 1. Спектры флуоресценции пирена в микросомах печени интактных и облученных животных.

Коэффициент эксимеризации пирена рассчитывали по отношению интенсивности флуоресценции эксимеров (480 нм) и мономеров (390 нм).

Флуоресценцию 1,8-АНС возбуждали при длине волны 365 нм, а регистрировали при 470 нм. Исследование сродства мембран микросом к 1,8-АНС проводили путем последовательных добавок зонда (до концентрации 2, 4, 6, 8 и 10 мкМ) в среду, содержащую 100 мМ трис-НСI буфер рН 7.4 и 0.75-0.80 мг белка на 1 мл при постоянном перемешивании.

Интенсивность аскорбат- Fe^{2+} -индуцированного ПОЛ определяли, инкубируя микросомы печени крыс в среде, содержащей: 100 мМ трис-НСI буфер, рН 7.4, 0.5 мМ аскорбат, 12 мкМ соли Мора. Определение малонового диальдегида (МДА) проводили как описано в [9]. Спектры поглощения окрашенного продукта записывали на спектрофотометре Specord VV.VIS и рассчитывали количество МДА, используя коэффициент молярной экстинкции равный $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Определение содержания гидроперекисей липидов в микросомах печени крыс проводили по методу Охкавы и соавторов с небольшими изменениями [10]. Содержание белка в микросомах определяли по методу Лоури и соавт. в модификации Миллера [11].

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента-Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование структурного состояния мембран микросом, которое оценивали по интенсивности флуоресценции пирена, величине коэффициента эксимеризации зонда, интенсивности флуоресценции 1,8-АНС и его константы связывания с мембраной позволило установить следующее.

Интенсивность флуоресценции 1,8-АНС в микросомах печени крыс, содержащихся в течение 50 дней на сбалансированном рационе вивария (1 группа), несбалансированном по животным белкам и витаминам антиоксидантного ряда рационе (3 группа) и животные, получавшие в течение 20 дней пищевую добавку аронии черноплодной 5 группа) была практически одинаковой при всех изученных концентрациях зонда (Рис. 2).

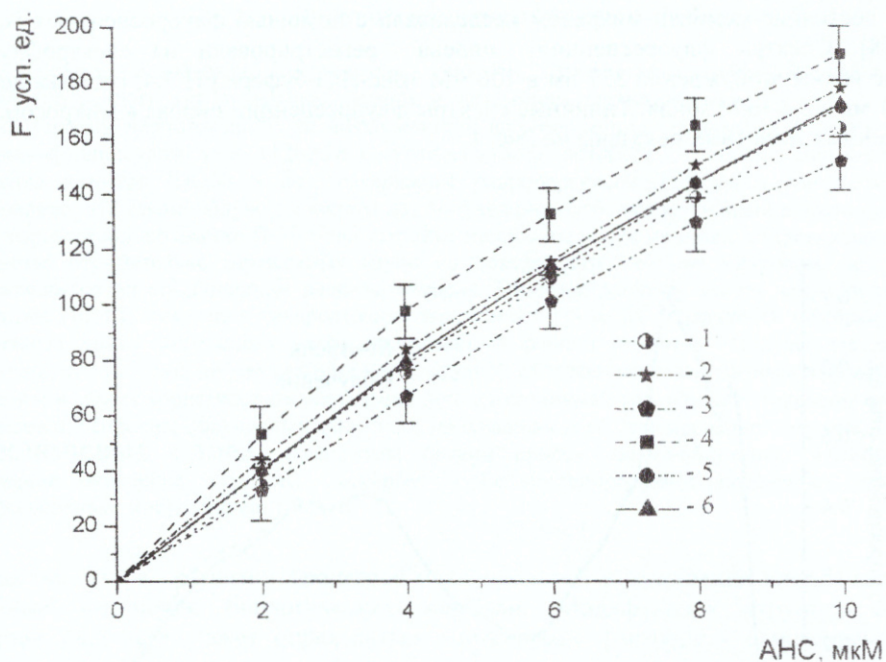


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции 1,8-АНС в микросомах печени крыс, где 1 – стандартный рацион питания вивария, 2 – стандартный рацион питания + γ -облучение, 3 – несбалансированная (по животным белкам и витаминам антиоксидантного ряда) диета, 4 – несбалансированная диета + γ -облучение, 5 – несбалансированная диета + добавка аронии черноплодной, 6 – несбалансированная диета + добавка аронии черноплодной + γ -облучение. Те же обозначения соблюдены далее по тексту.

В ответ на гамма-облучение интенсивность флуоресценции 1,8-АНС в микросомах печени животных 2-й группы увеличивалась. При этом более выраженное увеличение интенсивности флуоресценции было при добавлении относительно малых концентраций зонда (Рис. 2). Еще более выраженное увеличение интенсивности флуоресценции 1,8-АНС обнаружено в микросомах печени облученных крыс, которые содержались на несбалансированной диете (группа 4). Так, у этих животных по сравнению с соответствующими необлученными крысами (группа 3) интенсивность флуоресценции при концентрации зонда 2 мкМ увеличивалась более, чем в 1.6 раза (Рис. 2). Вместе с тем, облучение животных, содержащихся на несбалансированной диете, но получавших в течение 20 дней аронию черноплодную (группа 6) не приводило к увеличению интенсивности флуоресценции 1,8-АНС в микросомах.

Константы связывания (K_s) 1,8-АНС в микросомах печени крыс в ответ на воздействие только алиментарных факторов несколько увеличивались (на 20% и 8% при несбалансированном рационе питания и при введении пищевой добавки, соответственно). Однако, эти изменения были статистически незначимы (Рис. 3). Облучение животных, содержащихся на сбалансированном рационе питания (группа 2), приводило к снижению K_s в 1.9 раза по сравнению с необлученными крысами. Еще более выраженное снижение K_s 1,8-АНС было обнаружено у облученных крыс, содержащихся на несбалансированном рационе питания (Рис. 3). В этом случае K_s снижалась в 2.6 раза по сравнению с

животными 3 группы. Облучение животных, получавших дополнительно аронию черноплодную не приводило к существенным изменениям K_s 1,8-АНС в микросомах печени.

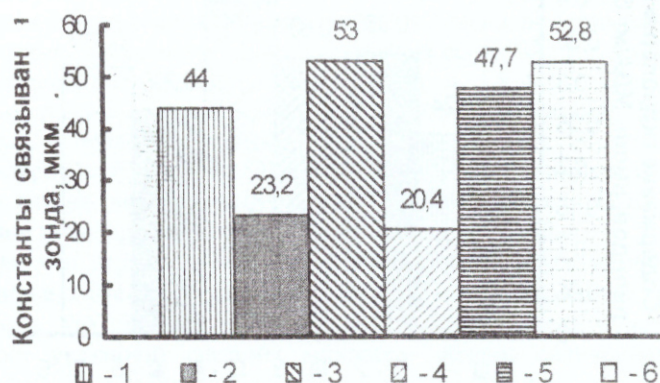


Рис. 3. Константы связывания 1,8-АНС в микросомах печени крыс. (Пояснения к обозначениям 1-6 смотри Рис. 2.)

Обнаруженное снижение K_s 1,8-АНС в ответ на гамма-облучение, свидетельствующее об увеличении сродства зонда к микросомальной мембране может быть основной причиной увеличения интенсивности флуоресценции 1,8-АНС.

Из данных литературы известно, что увеличение интенсивности флуоресценции 1,8-АНС при действии ряда факторов, обусловлено, в основном, снижением отрицательного заряда на поверхности мембран [8], поэтому можно предположить, что однократное гамма-облучение вызывает изменение распределения заряженных групп на поверхности мембран микросом печени. При этом важно подчеркнуть, что несбалансированный рацион усиливает эти изменения, а добавка рябины черноплодной полностью их нивелирует.

Исследование структурного состояния мембран микросом печени с помощью другого флуоресцентного зонда пирена позволило установить, что интенсивность флуоресценции эксимеров и мономеров пирена при действии γ -облучения, алиментарных факторов и их совместного действия, существенно не изменялась (См. Таблицу).

Таблица. Интенсивность флуоресценции и константа эксимеризации пирена в микросомах печени крыс.

Варианты диеты	I_{390}	I_{480}	$K_s = I_{480} / I_{390}$
1	$0,698 \pm 0,015$	$0,460 \pm 0,031$	$0,657 \pm 0,031$
2	$0,682 \pm 0,013$	$0,426 \pm 0,020$	$0,623 \pm 0,023$
3	$0,689 \pm 0,013$	$0,462 \pm 0,038$	$0,666 \pm 0,042$
4	$0,714 \pm 0,012$	$0,477 \pm 0,027$	$0,664 \pm 0,029$
5	$0,694 \pm 0,021$	$0,438 \pm 0,032$	$0,627 \pm 0,033$
6	$0,704 \pm 0,009$	$0,463 \pm 0,026$	$0,655 \pm 0,029$

(Пояснения к обозначениям 1-6 смотри Рис. 2.)

При этом существенно не изменялась и длина волн в максимуме флуоресценции эксимеров и мономеров пирена в микросомах печени контрольных и облученных животных (Рис. 1). Не обнаружено достоверных изменений и коэффициента эксимеризации пирена у всех исследуемых групп животных (Таблица 1). В связи с тем, что эксимеризация пирена широко используется для оценки микровязкости липидной фазы искусственных и природных мембран [8,12], можно предположить, что при всех исследованных нами воздействиях значительных изменений текучести микросомальных мембран, по крайней мере, в зоне окружения зонда не происходит.

Исследование интенсивности свободнорадикального окисления липидов мембран микросом, как интегрального показателя структурного состояния мембран, позволило установить, что содержание гидроперекисей липидов в ответ на гамма-облучение, несбалансированный рацион и на их совместное действие значительно увеличивалось (Рис. 4).

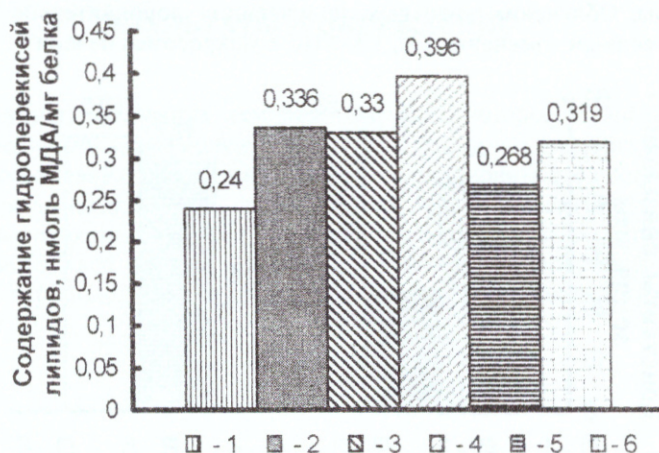


Рис. 4. Содержание гидроперекисей липидов в микросомах печени крыс. (Пояснения к обозначениям 1-6 смотри Рис. 2.)

При этом важно отметить, что облучение животных, содержащихся на несбалансированном рационе, приводило к более выраженному увеличению содержания гидроперекисей липидов в микросомах печени. Применение на фоне несбалансированной диеты аронии черноплодной, снижало накопление гидроперекисей липидов практически до уровня, характерного крысам, содержащимся на полноценном рационе (Рис. 4). При облучении животных, получавших дополнительно аронию черноплодную, содержание гидроперекисей липидов несколько увеличивалось (на 15.3%), но при этом оставалось достоверно ниже, чем у облученных крыс 4 группы, которые не получали пищевой добавки (Рис. 4).

Исследование в условиях *in vitro* интенсивности ПОЛ микросом печени крыс при индукции этого процесса аскорбат- Fe^{2+} позволило установить, что при действии гамма-облучения, несбалансированной диеты и их совместного действия, скорость накопления МДА увеличивалась в 1.41, 1.30 и 1.49 раз соответственно (Рис. 5). Добавка в несбалансированный по белкам и витаминам рацион крыс (5 группа) аронии черноплодной снижала скорость накопления МДА и достоверно не увеличивала ПОЛ при облучении животных (6 группа).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что гамма-облучение животных в дозе 8 Гр увеличивает интенсивность аскорбат- Fe^{2+} -индуцированного ПОЛ и содержание гидроперекисей липидов в микросомах печени крыс, получавших сбалансированный рацион вивария. Эти результаты качественно согласуются с ранее полученными нами данными [13] и данными других авторов [14] и могут объясняться снижением активности антиоксидантной системы организма. Снижением активности антиоксидантной системы можно объяснить обнаруженное нами увеличение интенсивности ПОЛ в микросомах печени крыс получавших сбалансированный по белкам и витаминам антиоксидантного ряда рацион и, особенно, выраженное увеличение ПОЛ при облучении этих животных. В связи с этим, обнаруженное нами снижение интенсивности ПОЛ в микросомах печени подопытных животных 5-й и 6-й групп, которые в течение 20 дней получали аронию черноплодную, по-видимому, связано с увеличением надежности антиоксидантной системы.

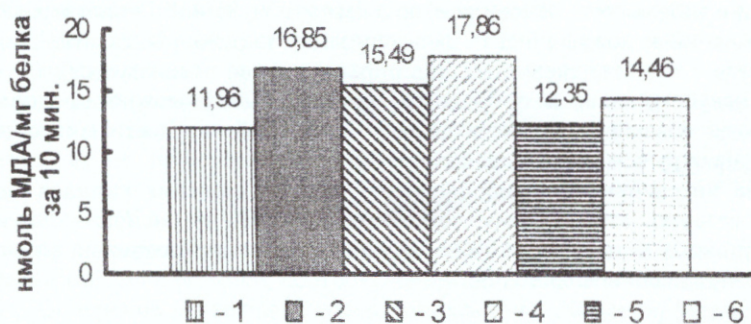


Рис. 5. Интенсивность аскорбат- Fe^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс. (Пояснения к обозначениям 1-6 смотри Рис. 2.)

Подтверждением этого могут служить данные о том, что с одной стороны, плоды аронии черноплодной содержат значительное количество антиоксидантов - α -токоферола, аскорбиновой кислоты, каротиноидов и др., а с другой - введение препарата из аронии черноплодной крысам увеличивает более чем в 5 раз содержание витамина А в печени экспериментальных животных [15].

Анализируя данные, характеризующие структурное состояние мембран микросом, полученные при исследовании интенсивности флуоресценции пирена и 1.8-АНС, следует заключить, что гамма-облучение животных, получавших несбалансированный рацион питания, приводит к более выраженной перестройке мембран, сопровождающейся снижением количества отрицательно заряженных групп на липид-белковой поверхности мембран, чем облучение крыс, содержащихся на стандартном рационе вивария. И в этом случае, как и при исследовании интенсивности ПОЛ микросом пищевая добавка аронии черноплодной нивелировала структурные изменения мембран.

В связи с тем, что структурное состояние микросомальных мембран в значительной степени определяет функциональные свойства мембраносвязанных ферментов монооксигеназной системы, можно предположить, что пищевая добавка аронии черноплодной будет эффективно корректировать нарушение функции указанной системы микросом печени облученного организма и, особенно, облученного организма, получающего несбалансированное питание.

ВЫВОДЫ

1. Гамма-облучение животных, получавших несбалансированный рацион питания, приводит к более выраженной активации ПОЛ и перестройке микросомальных мембран, сопровождающейся снижением количества отрицательно заряженных групп на поверхности мембран микросом.
2. Пищевая добавка аронии черноплодной нивелировала активацию ПОЛ и изменения распределения заряженных групп на поверхности мембран микросом печени облученных крыс, получавших несбалансированный рацион питания.
3. Арония черноплодная обладает антиоксидантным и мембранопротекторным действием и может корректировать функцию монооксигеназной системы микросом печени облученного организма и, особенно, облученных животных, получавших несбалансированное питание.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г.П. Горбенко В.Д. Крупин, А.В. Финашин, В.В. Товстяк // Укр. Биохим. журн.- 1993.- Т. 68.- N 1.- С. 74-77.
2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гоместаз в норме и патологии / Под ред. Ю.А. Зозули.- К.: Наук. думка, 1997.- 420 с.
3. Буралкова Е.Б. Храпова Н.Г. // Успехи химии.- 1985.- Т. 543. № 9.- С. 1540-1558.
4. Тутельян В.А. // Вопросы питания.-1996.- № 6.- С. 3-11.
5. Корзун В.М., Сагло В.І., Парац А.М. // Укр. медицинский часопис.- 2002.- № 6 (32).-I/II.- С.99-104.
6. Радиопротекторное питание: современное состояние проблемы. Сообщение 2. / В.В. Ванханен, И.П. Козьярин, В.И. Циприян, А.П. Ивахно, С.С. Островская, В.И. Пономаренко // Укр. Мед.Часопис.- 2003.- № 1 (33).- I/II.- С.53-59.
7. Лемешко В.В. // Биохимия.-1980.- Т.45. № 11.- С. 1964-1969.
8. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.- М.: Наука, 1980.- 320 с.
9. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.- М.: Наука.- 1972.- 252 с.
10. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В. // Укр. Биохим. Журнал.- 1986.- Т.58.- № 6.- С.67-70.
11. Miller S.I. // Anal.Chem.- 1959.-V. 3.- N 5.- P. 964-966.
12. Самойленко С.Г., Калер Г.В., Конев С.В. // Биофизика.- 1999.-Т. 44.- Вып. 3. - С.455-460
13. Ткаченко В.Н., Горбенко Г.П., Дюбко Т.С., Крупин В.Д., Курилко С.А., Товстяк В.В. // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1994.-Т. 34.- Вып. 4-5.- С.627-630.
14. Легонькова Л.Ф., Абакумов Г.З., Бушла М.И., Лукиенко П.И. // Вопр. мед. химии.- 1990.-С.26-28.
15. Падалко В.И., Никитченко Ю.В., Оболенцева Г.В., Козлова Е.В. // Фармаком.- 1999.- № 1.- С.19-23.