

¹Л.І. Степанова,
¹С.В. Хижняк,
¹А.В. Клепко,
²Л.В. Бабич,
²Н.В. Диденко,
¹В.М. Войціцький

Оцінка синтезу ліпідів у ентероцитах слизової оболонки тонкої кишки за дії йонізуючої радіації

¹Київський національний
університет

ім. Тараса Шевченка,

²Клінічна лікарня «Феофанія»
ДУС при КМ України,

Київ

The evaluation of lipid synthesis in small
intestine mucosa enterocytes at radiation
exposure

Цель работы: Оценить синтез липидов на основании результатов включения меченого ацетата в липидные фракции апикальной мембраны (АМ) энтероцитов тонкого кишечника через 24, 48 и 72 ч после действия ионизирующей радиации в диапазоне доз 0,1–6,0 Гр.

Материалы и методы: Исследования проведены на препаратах апикальной мембраны энтероцитов тонкой кишки крыс, которым за 10 мин до декапитации вводили 2-¹⁴С-ацетат в дозе 0,3 мКи на 1 кг массы тела. Полученные из мембранного препарата липиды и холестерол разделяли методом тонкослойной хроматографии на отдельные пятна, которые вырезали и определяли их радиоактивность в толуольной сцинтилляционной жидкости ЖС-107. Содержание меченого ацетата в пробах рассчитывали, учитывая известную радиоактивность стандарта.

Результаты: Анализ полученных результатов по интенсивности включения 2-¹⁴С-ацетата в общую фракцию липидов, фосфолипидов и холестерола свидетельствует об активации их биосинтеза с повышением дозы облучения. Причем с увеличением срока после облучения наблюдается тенденция приближения к контрольным значениям величины включения 2-¹⁴С-ацетата в липидные фракции апикальной мембраны энтероцитов.

Выводы: Выявленная активация включения 2-¹⁴С-ацетата в разные фракции липидов после однократного облучения в дозах от 1,0 до 6,0 Гр указывает на протекание восстановительных процессов в апикальной мембране энтероцитов тонкой кишки крыс в пострадиационный период.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, тонкий кишечник, апикальная мембрана, липиды.

Objective: To evaluate lipid synthesis basing on the findings of labeled acetate annexation to lipid fractions of the apical membrane (AM) of small intestine enterocytes 24, 48, 72 hours after the exposure to ionizing radiation at a dose range of 0.1–6.0 Gy.

Material and Methods: The study was done on the specimens of small intestine apical membrane enterocytes of the rats which were administered 2-¹⁴C-acetate at a dose of 0.3 mCi per 1 kg of the body weight prior to decapitation. Lipids and cholesterol obtained from the membranes specimens were separated using thin-layer chromatography into separate spots which were cut out. Their activity was determined in toluol scintillation fluid ЖС-107. The amount of labeled acetate in the specimens was calculated taking into consideration the known standard radioactivity.

Results: The analysis of the obtained findings of 2-¹⁴C-acetate intensity annexation to total lipid, phospholipid and cholesterol fraction suggests their biosynthesis activation with the increase of exposure dose. The value of 2-¹⁴C-acetate annexation to lipid fractions of enterocyte apical membrane approaches to the control values with the prolongation of the term after the exposure.

Conclusion: The revealed activation of 2-¹⁴C-acetate annexation to various fractions of lipids after single exposure at a dose of 1.0 to 6.0 Gy suggests reparation processes in enterocyte apical membrane of the small intestine of rats after the exposure.

Key words: ionizing radiation, apical membrane, lipids.

Реалізацію функцій біологічних мембран зумовлює їх біохімічний склад. Робота ферментів, рецепторів, іонних каналів, внутріклітинний іонний гомеостаз значною мірою залежать від ліпідного складу мембран та співвідношення окремих його компонентів (фосфоліпідів, жирних кислот, холестеролу тощо) [1]. Це важливо враховувати при вивченні змін структури та функцій тонкої кишки, які відбуваються за дії йонізуючого випромінювання [2]. Вміст ліпідів у мембранах залежить від білок-ліпідних та ліпід-ліпідних взаємодій, інтенсивності перебігу процесів біосинтезу та розпаду, швидкості внутріклітинного транспорту ліпідів тощо [3].

Ефект дії опромінення проявляється в порушенні метаболічних процесів як на рівні субклітин, тканин, так і організму в цілому. Однією із причин порушення ліпідного складу мембран може бути відхилення процесів їх синтезу. Попередником при синтезі всіх ліпідів є ацетат [4, 5], визначення швидкості включення якого в мембранні ліпіди може свідчити про інтенсивність процесу синтезу.

Мета даної роботи полягала в дослідженні включення міченого ацетату в ліпідні фракції апикальної мембрани (АМ) ентероцитів тонкої кишки у різні терміни після дії йонізуючого випромінювання в діапазоні доз 0,1–6,0 Гр.

Методика дослідження

У дослідях використовували білих безпородних щурів-самців, масою 180–200 г, утримуваних у стаціонарних умовах віварію. Тварин разово тотально опромінювали на апараті РУМ-17 у дозах 0,1; 0,4; 1,0; 2,0; 3,0 та 6,0 Гр. Потужність експозиційної дози 0,17 Гр/хв, фільтри 0,5 мм Си і 1 мм Al, сила струму 5 мА, напруга 200 кВ, шкірно-фокусна відстань — 50 см. Контрольних та опромінених тварин декапітували з дотриманням правил евтаназії. Дослідження проводили через 1, 2, та 3 доби після дії іонізуючої радіації. Виділяли препарати АМ ентероцитів з контрольних та опромінених тварин згідно з методикою, описаною в праці [6], із незначними модифікаціями. Вміст білка в досліджуваних пробах визначали за методом Лоурі та ін. [7].

Для оцінки біосинтезу ліпідів контрольним та опроміненим тваринам за 10 хв до декапітації вводили внутрішньо $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат у дозі 0,3 мкМ на 1 кг маси тіла [8]. Ліпідний екстракт мембранних препаратів, які містили радіоізотопи, кількістю 300–400 мкг наносили на активовані пластинки Silufol (Чехія) розміром 10×15 см у вигляді смужок шириною 8–10 мм на відстані 1,5 см. Фосфоліпіди (ФЛ) та холестерол (ХС) розділяли за допомогою тонкошарової хроматографії [9], проявляли ліпіди паровою йодою. Отримані в результаті розділення плями ліпідів вирізували та визначали їх радіоактивність у толуольній скнтиляційній рідині ЖС-107. Вміст міченого попередника у пробах розраховували, виходячи з рівня радіоактивності стандарту. Радіоактивність вимірювали на рідинному скнтиляційному лічильнику Intertechnique-4000 (Франція). Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [10].

Результати та їх обговорення

Біосинтез ліпідів оцінювали *in vivo* за визначенням інтенсивності включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату в різні терміни після опромінювання у ліпідні фракції АМ ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки.

Вивчення включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату в загальну фракцію ліпідів (ЗФЛ) АМ ентероцитів свідчить, що опромінення щурів у дозах 0,1 та 0,4 Гр не призводить до вірогідних змін такого включення в різні терміни досліджень (табл. 1–3). Через 24 години після опромінення в дозах 1,0; 2,0; 3,0 та 6,0 Гр, спостерігається активація включення ацетату в ЗФЛ у середньому на 24, 41, 43 та 50 %, відповідно, інтенсивність якого після 3 діб дещо знижується порівняно з першою добою і становить за дії опромінення в дозах 2,0; 3,0 та 6,0 Гр 130–140 %, відносно контролю (див. табл. 3).

У подальшому досліджували включення міченого ацетату до фракцій фосфоліпідів (ФЛ) та холестеролу (ХС) — основних структурних компонент АМ ентероцитів, яку отримували із слизової оболонки тонкої кишки в різні тер-

міни після радіаційної дії. Спостерігається зростання включення міченого ацетату до фракції ФЛ у середньому на 24, 39, 41 та 48 % та ХС — на 32, 41, 56 та 59 %, відносно контролю, через 24 год після опромінення в дозах 1,0; 2,0; 3,0 та 6,0 Гр (див. табл. 1).

Відзначено активацію включення міченого ацетату до фракції ФЛ і через 48 год після дії іонізуючої радіації у дозах 1,0; 2,0; 3,0 та 6,0 Гр — на 21, 33, 33 та 41 %, відповідно (див. табл. 2). Встановлено також, що за дії радіації у цих дозах вірогідно збільшується включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату до фракції ХС — відповідно на 26, 30, 35 та 50 %.

У кінцевий термін досліду — 72 год після опромінювання — спостерігається зменшення включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату до фракцій ФЛ та ХС, порівняно з попередніми термінами дослідження. Опромінення в дозах 0,1; 0,4 та 1,0 Гр вірогідних змін не викликає. За дії іонізуючої радіації в дозах 2,0; 3,0 та 6,0 Гр включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату до ФЛ збільшується від 32 до 39 % відносно контролю. Включення до фракції ХС збільшується на 30–42 % за опромінення в дозах 3,0 та 6,0 Гр (див. табл. 3).

Таким чином, зі збільшенням терміну після опромінювання, проявляється тенденція до наближення до контрольних значень величини включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату у досліджувані ліпідні фракції АМ ентероцитів. Слід зауважити, що оновлення ліпідів у ентероцитах тонкої кишки триває від 1 до 24 год, а оновлення клітин відбувається через 3–4 доби [12].

Однією з причин зростання швидкості включення мітки у мембранні ліпіди, крім порушення активності ліпідсинтезуючих ферментів, може бути викликане іонізуючою радіацією зниження можливості використання ^{14}C -ацетату, накопичення низькомолекулярних ^{14}C -метаболітів внаслідок порушення процесів їх використання та інше. Тобто, існує можливість з різних причин не використання мітки (^{14}C) ліпідсинтезуючими системами ентероцитів та її неспецифічного накопичення в слизовій оболонці тонкої кишки. Виходячи із цих міркувань, оцінку швидкості включення ^{14}C -ацетату в мембранні ліпіди проводили із врахуванням зміни кількості мітки в гомогенаті слизової

оболонки тонкої кишки. Можна припустити, що зростання включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату в ліпіди може бути наслідком збільшення його вмісту у слизовій оболонці тонкої кишки, наприклад, через зміни її проникності для міченого ацетату. Однак через 24, 48 та 72 год після опромінювання в досліджуваних дозах не спостерігається зростання неспецифічного включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату до гомогенної фракції слизової оболонки кишки порівняно з контролем (табл.4). Ґрунтуючись

Таблиця 1

Включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату (імп/хв · мг білка) у фракції ліпідів апікальної мембрани ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки через 24 год після опромінювання
 $2\text{-}^{14}\text{C}$ acetate annexation (pulse/min · mg protein) in lipid fraction of enterocyte apical membrane of small intestine mucosa 24 hours after the exposure

Умови досліджу	Об'єкт дослідження		
	загальна фракція ліпідів	фосфоліпіди	холестерол
Контроль	1128 ± 90	980 ± 88	138 ± 11
Доза, Гр			
0,1	1138 ± 91	970 ± 77	146 ± 13
0,4	1226 ± 98	1056 ± 84	163 ± 14
1,0	1400 ± 94*	1215 ± 97*	182 ± 16*
2,0	1599 ± 127*	1362 ± 108*	194 ± 14*
3,0	1616 ± 129*	1382 ± 110*	215 ± 19*
6,0	1688 ± 135*	1452 ± 116*	220 ± 19*

Примітка. Тут і далі: М ± m, n = 7; * p ≤ 0,05 відносно контролю.

Таблиця 2

Включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату (імп/хв · мг білка) у фракції ліпідів апікальної мембрани ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки через 48 год після опромінювання
 $2\text{-}^{14}\text{C}$ acetate annexation (pulse/min · mg protein) in lipid fraction of enterocyte apical membrane of small intestine mucosa 48 hours after the exposure

Умови досліджу	Об'єкт дослідження		
	загальна фракція ліпідів	фосфоліпіди	холестерол
Контроль	1128 ± 90	980 ± 88	138 ± 11
Доза, Гр			
0,1	1134 ± 90	986 ± 78	146 ± 13
0,4	1197 ± 95	1028 ± 82	148 ± 14
1,0	1346 ± 129	1187 ± 95	174 ± 15*
2,0	1534 ± 122*	1307 ± 104*	179 ± 16*
3,0	1522 ± 121*	1303 ± 104*	186 ± 16*
6,0	1602 ± 128*	1378 ± 110*	207 ± 18*

на одержаних результатах, можна зробити висновки, що йонізувальна радіація із зростанням доз опромінення до 6,0 Гр призводить до активації ліпогенезу в АМ ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки. Подібне зростання питомої радіоактивності ФЛ та ХС головного мозку щурів відмічено при загальному рентгенівському опроміненні в дозі 10,0 Гр [8].

Раніше нами було показано, що опромінення у досліджуваних дозах призводить до зниження вмісту ФЛ та ХС в АМ ентероцитів тонкої кишки [13]. Крім цього, за досліджуваних умов (із збільшенням дози опромінення) спостерігається активація процесів пероксид-

Таблиця 3

Включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату (імп/хв · мг білка) у фракції ліпідів апікальної мембрани ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки через 72 год після опромінювання
 $2\text{-}^{14}\text{C}$ acetate annexation (pulse/min · mg protein) in lipid fraction of enterocyte apical membrane of small intestine mucosa 72 hours after the exposure

Умови досліджу	Об'єкт дослідження		
	загальна фракція ліпідів	фосфоліпіди	холестерол
Контроль	1128 ± 90	980 ± 88	138 ± 11
Доза, Гр			
0,1	1136 ± 102	990 ± 79	144 ± 11
0,4	1189 ± 95	1020 ± 71	146 ± 14
1,0	1348 ± 130	1172 ± 109	164 ± 17
2,0	1487 ± 124*	1296 ± 103*	168 ± 16
3,0	1489 ± 120*	1292 ± 103*	179 ± 16*
6,0	1581 ± 129*	1364 ± 109*	196 ± 17*

Таблиця 4

Включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату (імп/хв · мг сух. тканини) у гомогенат слизової оболонки тонкої кишки після опромінювання
 $2\text{-}^{14}\text{C}$ acetate annexation (pulse/min · mg protein) in small intestine mucosa homogenate after the exposure

Умови досліджу	Час після опромінювання, год		
	24	48	72
Контроль	63 ± 5	63 ± 5	63 ± 5
Доза, Гр			
0,1	67 ± 6	66 ± 5	66 ± 5
0,4	64 ± 5	64 ± 5	65 ± 5
1,0	69 ± 6	68 ± 6	69 ± 5
2,0	61 ± 5	63 ± 5	67 ± 5
3,0	58 ± 5	60 ± 5	64 ± 5
6,0	65 ± 5	64 ± 5	64 ± 5

Література

ного окиснення ліпідів в АМ ентероцитів, зниження її мікров'язкості та зростання мембранної проникності [14]. Подібні зміни можуть призводити до зростання швидкості міжмембранного та міжтканинного перенесення ліпідів за умов дії йонізуючої радіації [15].

Водночас зменшення кількості ФЛ, можливо, в результаті активації пероксидного окиснення в клітинах слизової оболонки тонкої кишки, а також внаслідок збільшення інтенсивності їх обміну, вказує на перехід клітин у функціонально активний стан — процес відновлення. З іншого боку, зниження вмісту ХС в АМ ентероцитів та зростання його синтезу в досліджуваних дозах, можливо, індукується зменшенням вмісту цього ліпиду в інших органах [16]. Зважаючи на те, що клітини кишки є одним із основних продуцентів ХС для всього організму, зменшення вмісту ХС у АМ — результат постачання ХС до інших органів. Враховуючи значення ліпідів у клітинній проліферації, а також основну роль клітин тонкої кишки в продукуванні ХС для організму, можна припустити, що дефіцит його вмісту в інших органах, в свою чергу, індукує в тонкій кишці біосинтез цієї речовини.

Таким чином, виявлена радіаційно-індукована активація синтезу ХС і ФЛ у тонкій кишці може зумовлювати процеси відновлення клітин як тонкої кишки так і організму в цілому.

Висновки

1. Виявлено дозозалежне зростання включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату до загальної фракції ліпідів, ФЛ і ХС АМ ентероцитів тонкої кишки щурів після разового опромінення в дозах до $6,0\text{ Гр}$.

2. Найбільше включення $2\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетату до ліпідних фракцій апікальної мембрани відбувається в ранні терміни (24 години) після опромінення у досліджуваних дозах.

3. Отримані результати вказують на можливість перебігу відновлювальних процесів у АМ ентероцитів тонкої кишки за рентгенівського опромінення в дозах до $6,0\text{ Гр}$.

1. Болдырев А.А., Курелла Е.Г., Павлова Т.Н. и др. Биологические мембраны. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1992. — 142 с.
2. Stark G. // *Biochem. et biophys. Acta. Rev. Biomembranes.* — 1991. — Vol.1071, № 2. — P. 103–122.
3. Рыскулова С.Т. Радиационная биология плазматических мембран. — М.: Наука, 1982. — 150 с.
4. Крекс Е.М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
5. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Виноградова Р.П. та ін. Біохімія. — К.: Либідь, 1995. — 464 с.
6. Усатюк П.В. Біохімічна характеристика плазматичної мембрани та особливості регуляції епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби в онтогенезі та при порушенні функції: Дис. ... д-ра біол. наук. — К., 1994. — 237 с.
7. Lowry O.H., Rosenbrouch N.J., Fair A.L. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol.193, № 1. — P. 265–275.
8. Таранова Н.П. Липиды центральной нервной системы при повреждающих воздействиях. — Л.: Наука, 1988. — С.45–60.
9. Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж. Финдлея, У.Эванза. — М.: Мир, 1990. — 424 с.
10. Плохинский В.М. Математические методы в биологии. — М.: Из-во Моск. ун-та, 1981. — 265 с.
11. Кокунин В.А. // *Укр. биохим. журн.* — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776–790.
12. Морозов И.А., Лысиков Ю.А., Питран Б.В. Всасывание и секреция в тонкой кишке. — М.: Медицина, 1988. — 221 с.
13. Степанова Л.І., Степанов Ю.В., Войціцький В.М., Кучеренко М.Є. // *Укр. біохім. журн.* — 1999. — Т. 71, № 1. — С.48–52.
14. Степанова Л.І., Клепко А.В., Ромась І.І., Лапоша О.А., Левченко Л.В. // *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка: Біологія.* — 2005. — № 45–46. — С.49.
15. Коломийцева И.К. Радиационная биохимия мембранных липидов. — М.: Наука, 1989. — 53 с.
16. Хижняк С.В., Степанова Л.І., Ромась І.І., Прохорова А.О., Войціцький В.М. Дослідження структурного стану апікальної мембрани ентероцитів тонкої кишки щурів за дії іонізуючої радіації // *Зб. наук. праць Інституту ядерних досліджень.* — 2005. — № 3(16). — С.136–143.

Надходження до редакції 02.06.2006.

Прийнято 09.08.2006.

Адреса для листування:
Степанова Людмила Іванівна,
біологічний факультет Київського національного університету ім. Т. Шевченка,
вул. Володимирівська, 64, Київ, 01033, Україна