

СТРУКТУРНИЙ СТАН МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ МЕМБРАНИ ГЕПАТОЦИТІВ ЗА ДІЇ КАДМІЮ ТА ЙОГО КОРИГУВАННЯ

¹В.А. Грищенко, д.вет.н., ¹В.А. Томчук, к.біол.н., ²Л.І. Степанова, к.біол.н.,
¹С.В. Хижняк, д.біол.н.

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

РЕЗЮМЕ. *Порушення функціонування мітохондрій є одним із визначальних шляхів, за яким реалізується токсичний ефект Кадмію. Показано ефективність використання ліпосомальної форми біологічно активної добавки FLP-MD на основі фосфоліпідів молока у відновленні структурного стану внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів при надходженні Кадмію до організму щурів.*

Ключові слова: Кадмій, гепатоцити, внутрішня мембрана мітохондрій, флуоресцентні зонди, фосфоліпиди молока, ліпосоми.

РЕЗЮМЕ. *Нарушение функционирования митохондрий является одним из определяющих путей реализации токсического эффекта Кадмия. Показана эффективность использования липосомальной формы биологически активной добавки FLP-MD на основе фосфолипидов молока в восстановлении структурного состояния внутренней мембраны митохондрий гепатоцитов в условиях введения Кадмия в организм крыс.*

Ключевые слова: Кадмий, гепатоциты, внутренняя мембрана митохондрий, флуоресцентные зонды, фосфолипиды молока, липосомы.

SUMMARY. *The mitochondria dysfunction is one of the key ways of the Cadmium toxic effect realization. The use effectiveness of leptosomatic form of BAA FLP-MD as a reducer of the structural state of the hepatocyte mitochondria inner membrane after the Cadmium toxic effect was shown.*

Key words: Cadmium, hepatocytes, mitochondria inner membrane, fluorescent probes, milk phospholipids, liposomes.

В останні десятиліття у зв'язку з інтенсивним розвитком промисловості значно зріс вміст важких металів у довкіллі. Вони впливають на організм, що призводить до виникнення різноманітних патологічних станів не лише внаслідок гострої інтоксикації, але й за умов надходження до організму у відносно низьких концентраціях [1]. Кадмій входить до групи особливо небезпечних екоотоксикантів.

При надходженні до організму через травний канал Кадмій переважно всмоктується в тонкій кишці [2]. В результаті перорального поглинання він абсорбується в кишці, а далі надходить до печінки з порталним кровотоком та інтенсивно поглинається гепатоцитами.

Мітохондрії є чутливими клітинними органами до різних токсичних агентів. Це підтверджується зміною їхньої форми, структури та розмірів при морфологічних дослідженнях печінки тварин, які зазнавали дії солей важких металів [3]. За хронічної дії кадмій сульфату на організм щурів відбувається пошкодження мітохондріальних мембран гепатоцитів, що призводить до набрякання і деструкції мітохондрій. Окрім збільшення площі мітохондрій, у результаті набрякання спостерігається значне розшарування зовнішньої та внутрішньої мембран мітохондрій, деструкція крист [4]. Поряд зі збільшенням площі мітохондрій гепатоцитів відбувається і збільшення довжини зовнішньої мембрани мітохондрій. Відношення довжини внутрішньої мембрани міто-

хондрій до зовнішньої можуть відображати стан дихальної функції цих органел, оскільки в них розміщені ферменти окисного фосфорилювання і перенесення електронів [5].

Порушення функціонування мітохондрій є одним з визначальних механізмів, за яким реалізується токсичний ефект Кадмію [6]. Це пов'язують із переважним розподіленням Кадмію у мітохондріальній фракції клітин [3, 7].

Тому при надходженні в організм Кадмію важливого значення набуває використання препаратів 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 ФЛ молока [8].

Метою нашої роботи було дослідити структурні характеристики внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів при введенні в організм щурів кадмію хлориду та застосуванні ліпосомальної форми БАД FLP-MD.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження були проведені 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; у другій — тваринам упродовж 14 діб перорально вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг ма-

си тіла, що відповідає $1/50$ ЛД₅₀; у третій — тваринам вводили 1% розчин ліпосомальної форми БАД FLP-MD на основі ФЛ молока у дозі 13,5 мг/кг маси тіла упродовж 5 діб, а потім на тлі застосування біодобавки вводили кадмію хлорид у дозі 1,0 мг/кг маси тіла (впродовж 14 діб). Щурів декапітували після закінчення експерименту.

Мітохондрії гепатоцитів отримували методом диференційного центрифугування, а після заморожування-відтаювання цієї фракції та при подальшому її центрифугуванні при 25 000 g упродовж 30 хв отримували осад, який являв собою субмітохондріальні частинки — внутрішню мембрану мітохондрій (ВММ) [9].

Структурний стан мітохондріальної мембрани оцінювали за допомогою флуоресцентних зондів [10, 11], які локалізуються в різних ділянках біомембран: 1-анілінонафталін-8-сульфонат (АНС) — в основному на поверхні мембранного бішару, пірен — в зоні жирнокислотних ланцюгів ФЛ [11]. Крім того, вимірювали власну триптофанову флуоресценцію біомембран [12] та визначали ефективність індуктивно резонансного перенесення енергії (ІРПЕ) в донорно-акцепторних парах різної локалізації в біомембрані (пірен-АНС) [13].

При взаємодії з біомембраною 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 ($K_{АНС}$) і кількість місць зв'язування ($N_{АНС}$).

Результати експериментальних досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Зміни показників вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати роботи. У результаті проведених досліджень встановлено зниження інтенсив-

ності флуоресценції АНС при зв'язуванні з мембранними препаратами мітохондрій гепатоцитів в умовах надходження Кадмію до організму щурів (табл. 1). Це може бути зумовлено зниженням на 24,4 % кількості місць зв'язування зонду з ВММ.

При застосуванні піддослідним тваринам ліпосомальної форми БАД FLP-MD спостерігається відновлення величин досліджуваних показників. Слід відзначати, що введення тваринам тільки ліпосомальної форми БАД FLP-MD не впливає на показники структурного стану ВММ (ці дані не наведено).

Зміни кількості місць зв'язування АНС з біологічною мембраною є відображенням інтегральних процесів (зміни мікрооточення зонду, поверхневого заряду, структурних перебудов тощо), які протікають у мембрані за дії різноманітних чинників, враховуючи, що флуоресценція АНС визначається його складом [14]. Молекула АНС локалізується в полярній ділянці мембрани, утворюючи комплекси з білковими та ліпідними молекулами. Отримані результати щодо вивчення взаємодії флуоресцентного зонду АНС з ВММ можуть свідчити про зміну її поверхневої структури, що може зумовлюватися модифікацією як ліпідної компоненти в зоні полярних голівок гліцеролових залишків ФЛ, так і мембранних білків.

За умов надходження до організму щурів Кадмію знижується ступінь ексимеризації пірену для ВММ гепатоцитів у середньому на 17,9 % (N_{335}) та 20,0 % (N_{280}) і може свідчити про підвищення мікророзчинності ліпідної фази мембран (табл. 2). Введення шурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD на тлі надходження Кадмію призводить до покращення досліджуваних показників у препаратах ВММ. Зростання мікророзчинності ліпідної компоненти внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів може бути пов'язане зі структурними змінами білкових молекул (наприклад, окиснення сульфгідрильних груп) внаслідок надходження та накопичення Кадмію в гепатоцитах.

Таблиця 1

Спектральні характеристики зв'язаного з внутрішньою мембраною мітохондрій гепатоцитів щурів флуоресцентного зонду АНС 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	18,7 ± 1,4	12,7 ± 0,4
Cd	0,92 ± 0,05	19,6 ± 1,5	9,6 ± 0,5*
Cd+БАД FLP-MD	0,96 ± 0,03	18,8 ± 1,3	13,8 ± 0,3

* — $p \leq 0,05$ відносно контрольних значень.

Таблиця 2

Ступінь ексимеризації пірену в препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів 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	$0,28 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$
Cd	$0,23 \pm 0,02^*$	$0,20 \pm 0,03^*$
Cd+БАД FLP-MD	$0,26 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,02^*$

* — $p \leq 0,05$ відносно контрольних значень.

Таблиця 3

Триптофанова флуоресценція білкових молекул у препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів 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	1,00	$0,89 \pm 0,03$	$3,58 \pm 0,18$
Cd	$1,03 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,03$	$2,43 \pm 0,16^*$
Cd+БАД FLP-MD	$1,02 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,03$	$2,66 \pm 0,18^*$

* — $p \leq 0,05$ відносно контрольних значень.

Отримані дані вказують на зміни структурної впорядкованості ліпідної компоненти ВММ. В'язкість ліпідів, як відомо, є інтегральною величиною і залежить від складу ФЛ, вмісту холестеролу, який впорядковує структуру мембрани, рівня ненасичених жирних кислот, ступеня їхньої ненасиченості та від інтенсивності протікання ПОЛ у мембранах тощо [15]. Застосування ліпосомальної форми БАД FLP-MD в умовах дії на організм тварин іонів Кадмію покращує фізичні властивості (мікрров'язкість) ліпідної компоненти внутрішньої мітохондріальної мембрани гепатоцитів.

Емісійний спектр триптофанової флуоресценції мембранних білків для ВММ гепатоцитів подібний за всіх умов досліджу з $\lambda_{\max} = 340$ нм. Гасниками власної флуоресценції можуть бути розташовані поряд із триптофановими хромофорами: карбонільні групи пептидного зв'язку, бокові кінцеві карбоксильні та аміногрупи, дисульфідні групи та імідазол гістидину [16]. Застосування в якості гасника триптофанової флуоресценції — акриламід свідчить, що акриламід у середньому на 90 % гасить триптофанову флуоресценцію ВММ гепатоцитів за всіх умов досліджу.

Аналіз даних щодо гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції мембранних

препаратів при використанні модифікованого графіка Штерна-Фольмера представлено в табл. 3. За умов надходження до організму щурів Кадмію величина ефективної константи гасіння знижується для препаратів ВММ у середньому на 32,2 %. Відомо, що зміна константи гасіння (константа Штерна-Фольмера, K_{SV}) відображає внутрішньо-молекулярну динаміку отриманих білкових молекул [16].

Таким чином, зниження ефективності гасіння триптофанової флуоресценції, про що свідчить K_{SV} , може бути зумовлено збільшенням структурної жорсткості мембранних білків [17]. Використання ліпосомальної форми БАД FLP-MD на тлі надходження Кадмію призводить до змін, подібних як і для окремого введення металу.

Отримані результати вказують на конформаційну модифікацію білкових молекул мембран мітохондрій гепатоцитів при надходженні Кадмію в організм щурів. За умов профілактичного введення ліпосомальної форми БАД FLP-MD, як і за окремої дії Кадмію, характерним є збільшення структурної жорсткості мембранних білків. Водночас, інші структурні характеристики внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів за умов введення ліпосомальної форми БАД FLP-MD відновлюються до контрольних значень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / [Д.О. Мельничук, В.А. Грищенко, В.А. Томчук та ін.]: за ред. Д.О. Мельничука. — К.: НУБіП України, 2010. — 400 с.
2. Уголев А. М. Мембранное пищеварение и всасывание при физиологических условиях. Пересмотр современных взглядов / А.М. Уголев, Б.З. Зарипов, А.А. Груздков // Мембранное пищеварение и всасывание. — Рига, 1986. — С. 142—144.
3. Fowler B.A. Mechanisms of kidney cell injury from metals / B.A. Fowler // *Envir. Health Persp.* — 1992. — V.100. — P. 56-63.
4. Ходоренко А.В. Влияние сульфата кадмия на ультраструктуру гепатоцитов крыс в онтогенезе / А.В. Ходоренко, Т.М.Шалахметова, Г.В. Федотовских // *Актуальн. вопросы гепатол.* — 1999. — № 1. — С. 36—39.
5. Muller L. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation / L. Muller // *Toxicology.* — 1986. — V. 40. — P. 285—295.
6. Хижняк С.В. Клітинні механізми токсичності кадмію / С.В. Хижняк. — К.: Видавництво "LAT & K", 2010. — 213 с.
7. Legare M. E. Low-level lead exposure in cultured astroglia: identification of cellular targets with vital fluorescent process / M.E. Legare, R. Barhomi, R.S. Burghardt // *Neurotoxicol.* — 1993. — V. 14, № 2-3. — P. 267—272.
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 / Д.О. Мельничук, В.А. Грищенко, О.М. Литвиненко; заявник і патентовласник НУБіП України. — № а 200710252; заявл. 14.09.2007; опубл. 27.042009, 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. 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.
11. Владимиров Ю. А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю. А. Владимиров, Г. Е. Добрецов. — М.: Наука, 1980. — 320 с.
12. Лактович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лактович. — М.: Мир, 1986. — 236 с.
13. 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.
14. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов / Г. Е. Добрецов. — М.: Наука, 1989. — 277 с.
15. Рыскулова С.Т. Радиационная биология плазматических мембран / С.Т. Рыскулова. — М.: Энергоатомиздат, 1986. — 128 с.
16. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков / А.П. Демченко — К.: Наук. думка, 1988. — 280 с.
17. Дослідження дії фосфоліпидовмісної добавки на мембрани гепатоцитів / О. Литвиненко, Л. Степанова, В. Грищенко [та ін.] // *Вісник Київського університету імені Тараса Шевченка. Біологія.* — 2008. — Вип. 52—53. — С. 10—12.

Надійшла до редакції 25.05.2012 р.