

ном аглютинацію клітин і кепінг лектинових рецепторів. Виявлено збільшення швидкості обох процесів за нелетальних доз освітлення. Обговорюється можлива роль пошкоджень цитоскелетних білків у фотомодифікації рецепторних властивостей клітин.

Summary. Effect of illumination in the presence of the sensitizers (hematoporphyrin and merocyanine 540) on phytohemagglutinin-induced lymphocytes agglutination and lectin receptors capping was studied. The increase of velocity of both processes under non-lethal of illumination has been shown. A possible role of cytoskeletal proteins damage in the photomodification of cell receptor characteristics is discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dougherty T. J.* Photodynamic therapy // Clin. in chest med.— 1985.— 6, N 2.— P. 219—236.
2. *Sieber F., Spivak J. L., Sutcliffe A. M.* Selective killing leukemic cells by merocyanine 540-mediated photosensitization // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 23.— P. 7584—7587.
3. *Хейфиц Л. Б., Абалякин В. А.* Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл // Лаб. дело.—1973.— № 10.— С. 579—581.
4. *Черницкий Е. А., Воробей А. В.* Фотосенсибилизированные повреждения биологических мембран // Молекуляр. механизмы биол. действия опт. излучения.— М.: Наука, 1988.— С. 102—111.
5. *Kubasova T., Koteles G. J., Varga L. P.* Surface alteration of mammalian cells upon ionizing radiation as detected by a lectine-binding technique. II. Binding of concanavalin A by human blood cell X-irradiated *in vitro* // Int. J. Radiat. Biol.—1981.— 40, N 2.— P. 187—194.
6. *Шуканова Н. А., Лобанок Е. С., Воробей А. В.* Изменение структурно-функциональных параметров мембран тимоцитов при облучении животных // Материалы I науч.-практ. конф.— Минск, 1989.— С. 164—168.
7. *Воробей А. В., Вадецкая Т. Н., Егорова Г. Д., Черницкий Е. А.* Сенсибилизируемые тетрасульфофенилпорфином фотоповреждения эритроцитарных мембран // Вестн АН БССР, сер. биол. наук.—1985.— № 4.— С. 103—105.
8. *Nicolson G. L., Poste G.* The cancer cell: Dynamic aspects and modifications in cell-surface organization // N. Engl. J. Med.—1976.—295, N 4.— P. 197—203.
9. *Loor F.* Plasma membrane and cell cortex interactions in lymphocyte function // Adv. Immunol.—1980.—30.— P. 1—120.
10. *Patarroyo M., Gahmberg C.-G.* Phorbol 12,13-dibutyrate enhances lateral redistribution of membrane glycoproteins in human blood lymphocytes // Eur. J. Immunol.—1984.—14, N 9.— P. 781—787.
11. *Fidelus R. K.* The generation of oxygen radicals: a positive signal for lymphocyte activation // Cell. Immunol.—1988.—113, N 1.— P. 175—182.
12. *Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н.* Ингибирующее действие перехватчиков активных форм кислорода на эндоцитоз конканавалина А лимфоцитами // Биофизика.— 1987.—32, № 3.— С. 434—437.
13. *Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н., Самаль А. Б.* Роль активных форм кислорода в конканавалин А-индуцированной аглютинации лимфоцитов // Вестник БГУ. Хим. биол. и географ.—1986.— № 3.— С. 47—50.

Ин-т фотобиологии АН Беларуси, Минск

Получено 10.05.93

УДК 577.391

В. И. Древаль

ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРЫС НА СТРУКТУРУ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ТИМОЦИТОВ

Крыс ежедневно подвергали γ -облучению в дозе 50 Рад и определяли связывание с плазматическими мембранами тимоцитов 1-анилинафталин-8-сульфоната, вязкость липидов с использованием флуоресцентного зонда пирена и константу Штерна-Фольмера для мембранных белков. Полученные данные характеризуют особенности изменения структуры плазматических мембран тимуса в результате компенсаторно-приспособительных реакций организма к действию ионизирующей радиации в малых дозах.

© В. И. Древаль, 1993

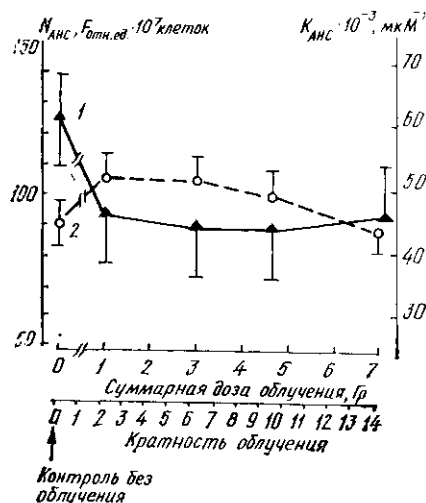
Введение. В предыдущей работе нами охарактеризовано изменение структуры плазматических мембран тимоцитов при однократном воздействии на животных летальных и сублетальных доз ионизирующей радиации [1]. Результаты изучения последствий аварии на Чернобыльской АЭС указывают на особенности влияния малых доз радиации на организм [2]. В связи с этим представляло интерес исследовать характер изменения структуры липидного и белкового компонентов плазматических мембран тимоцитов при фракционированном облучении животных дозой, не вызывающей острой лучевой болезни.

Материалы и методы. В опытах использовали крыс-самцов линии «Вистар» массой 100—120 г. Животных ежедневно подвергали γ -облучению в дозе 50 Рад на изотопной установке «Исследователь» (^{60}Co) с мощностью источника 1500 Р/мин. Крыс декапитировали после 2-, 6-, 9- и 14-кратного облучения.

Тимоциты выделяли, как описано ранее [1].

Константу связывания ($K_{\text{АНС}}$) и число мест связывания ($N_{\text{АНС}}$) флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) с тимоидами регистрировали на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-2A» (Япония) при $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 480$ нм по методу [3].

Рис. 1. Изменение константы связывания $K_{\text{АНС}}$ (1) и числа мест связывания $N_{\text{АНС}}$ (2) с плазматическими мембранами тимоцитов крыс



Для определения микровязкости анулярных и свободных липидов плазматических мембран тимоцитов изучали степень эксимеризации $F_{\text{э}}/F_{\text{м}}$ флуоресцентного зонда пирена ($F_{\text{м}}, F_{\text{э}}$ — интенсивность флуоресценции мономеров и эксимеров пирена соответственно) [4].

Константу Штерна — Фольмера (K_{SV}) для тушения белковой флуоресценции акриламидом (0,08—0,38 М) находили при $\lambda_{\text{возб}} = 285$ нм и $\lambda_{\text{фл}} = 330$ нм [5].

Обработку экспериментальных данных проводили с использованием t -критерия Стьюдента [6].

Результаты и обсуждение. Связывание отрицательно заряженного зонда АНС с плазматической мембраной клетки определяется как числом мест связывания на мембране, так и константой связывания с отдельным центром сорбции [7]. Изучение связывания АНС с плазматическими мембранами тимоцитов показало (рис. 1) существенные различия в динамике $K_{\text{АНС}}$ и $N_{\text{АНС}}$. При фракционированном облучении крыс $N_{\text{АНС}}$ меняется незначительно в отличие от эффекта радиации при однократном воздействии [1]. Константа связывания при двукратном облучении (суммарная доза 1 Гр) снижается на 25 % ($p > 0,05$) и при дальнейшем облучении не меняется. Известно, что поверхность плазматической мембраны клетки несет отрицательный заряд [8], поэтому наблюдаемые изменения связывания отрицательно заряженного зонда АНС будут в первую очередь определяться изменением поверхностного потенциала мембраны [9]. Константа связывания АНС с мембраной зависит от поверхностного потенциала мембраны [10]:

$$K_a = K_a^0 \exp \frac{-Z \cdot e \cdot \varphi}{K_f \cdot T},$$

где K_a^0 — константа связывания для незаряженной мембраны; Z — кратность заряда зонда; e — заряд электрона; K_f — константа Больцмана; T — абсолютная температура.

Для двух различных значений поверхностных потенциалов φ_1 (для плазматических мембран тимоцитов необлученных животных) и φ_2 (для мембран животных, облученных в суммарной дозе 7 Гр):

$$\frac{K_{a1}}{K_{a2}} = \exp \frac{Z \cdot \varepsilon \cdot \Delta\varphi}{K_f \cdot T},$$

где $\Delta\varphi = \frac{K_f \cdot T}{Z \cdot \varepsilon} \ln \frac{K_{a1}}{K_{a2}}$.

Таким образом, в случае фракционированного облучения крыс при суммарной дозе 7 Гр наблюдается снижение отрицательного заряда ти-

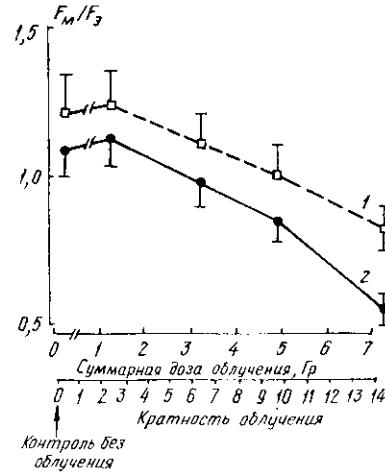
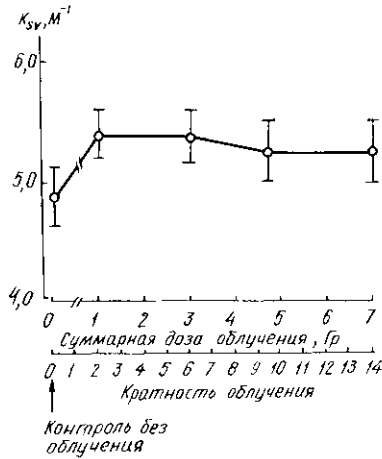


Рис. 2. Изменение константы Штерна — Фольмера (K_{sv}) для белков плазматических мембран тимоцитов облученных крыс

Рис. 3. Изменение эксимеризации флуоресцентного зонда пирена для аннулярных (1) и не связанных с белками (2) липидов плазматических мембран тимоцитов

моцитов на 7,5 мВ. Очевидно, полученные данные указывают на определенные изменения поверхностной структуры плазматических мембран тимоцитов в результате облучения животных, что может определяться как изменением структуры липидной компоненты мембран в области полярных головок и глицериновых остатков фосфолипидов, так и конформационными перестройками мембранных белков [7, 9].

Для регистрации конформационных изменений белков плазматических мембран определяли константу Штерна — Фольмера при тушении акриламидом триптофановой флуоресценции белков [5]. Из данных рис. 2 следует, что при суммарной дозе 1 Гр K_{sv} возрастает на 10% ($p > 0,05$) и с дальнейшим увеличением суммарной дозы не изменяется. Это указывает на тенденцию к уменьшению структурной жесткости мембранных белков [11]. Можно заключить, что при фракционированном облучении животных структура белков плазматических мембран тимоцитов подвержена изменениям в меньшей степени по сравнению с однократно облученными животными в дозах 1,5—10 Гр [1].

Исследование вязкости липидной компоненты плазматических мембран проводили с использованием флуоресцентного зонда пирена, локализуемого в зоне жирнокислотных цепей фосфолипидов [7]. Сравнивали влияние ионизирующего излучения на вязкость двух фракций мембранных липидов: непосредственно контактирующих с мембранными белками (аннулярных липидов) и свободных, удаленных на расстояние свыше 3 нм от белковых глобул [4]. При суммарной дозе 1 Гр вязкость липидного компонента плазматических мембран тимоцитов достоверно не изменяется ($p > 0,05$) (рис. 3). Но возрастание суммарной дозы облучения животных до 7 Гр приводит к снижению вязкости аннулярных липидов в 1,5 раза ($p < 0,01$), а свободных липидов — в 2 раза ($p < 0,01$). Это подтверждает экспериментальные данные о сущест-

венных изменениях вязкости липидной компоненты мембран клеток при воздействии радиации [12]. Вместе с тем наблюдаемый характер изменения вязкости липидов плазматических мембран тимоцитов при фракционированном облучении значительно отличается от колебаний вязкости липидов в пострadiационный период при однократном облучении животных [1].

Полученные результаты позволяют заключить, что фракционированное облучение животных в нелетальных дозах вызывает изменение вязкости липидной компоненты плазматических мембран тимоцитов. Структура мембранных белков при этом существенно не нарушается. Очевидно, перестройка липидной компоненты плазматической мембраны приводит к модификации ее поверхностных свойств, что определяет изменения параметров связывания флуоресцентного зонда АНС [9]. Особенности изменения структуры плазматических мембран тимоцитов при фракционированном облучении животных позволяют заключить, что последнее обуславливает менее значимые нарушения структуры мембран по сравнению с однократным воздействием на животных ионизирующего излучения в дозах, вызывающих острую лучевую болезнь. Такое уменьшение эффективности радиационного воздействия при фракционировании дозы объясняют репаративными процессами, протекающими в промежутках между облучениями и способствующими уменьшению радиационных повреждений [13, 14].

Резюме. Щурів кожного дня піддавали γ -опроміненню у дозі 50 Рад та визначали зв'язування з плазматичними мембранами тимоцитів 1-анілінонафталін-8-сульфонату, в'язкість ліпідів з використанням флуоресцентного зонда пірена та константу Штерна—Фольмера для мембранних білків. Отримані дані характеризують особливості зміни структури плазматичних мембран тимуса в результаті компенсаторно-приспосувальних реакцій організму до дії іонізуючої радіації у малих дозах.

Summary. The rats was irradiation every day at doses 50 Rad. The binding with thymocytes of 1-anilino-naphthaleno-8-sulphonate, the eximerization degree of pyrene and constant of Shtern-Folmer for membrane proteins were studied. The change of binding ANS and viscous lipids in plasma membranes has been shown.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Древаль В. И. Пострадиационные изменения структуры липидов и белков плазматических мембран тимоцитов // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 1.—С. 35—39.
2. Руднев М. И., Замостьян В. П., Боер В. А. и др. Экспериментальное изучение последствий аварии на ЧАЭС // 1-й Всесоюз. радиобиол. съезд: Тез. докл.—Пушкино, 1989.—Т. 2.—С. 522—532.
3. Agüero R., Pico G., Guibert E., Corchs J. Interaction of the organic anion 1-aniline-8-naphthalene sulfonate (ANS) with isolated rat hepatocytes // Comp. Biochem. Physiol.—1987.—86B, N 1.—P. 7—10.
4. Литвинов И. С., Образцов В. В. Изучение вязкости свободных и связанных с белками липидов в мембранах // Биофизика.—1982.—27, № 1.—С. 81—85.
5. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.—М.: Мир, 1986.—496 с.
6. Бейли Н. Статистические методы в биологии.—М.: ИНОГИЗ, 1962.—260 с.
7. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.—М.: Наука, 1980.—320 с.
8. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт.—М.: Мир, 1980.—341 с.
9. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов.—М.: Наука, 1989.—277 с.
10. Woitcza K. L., Nalecz M. Surface charge of biological membranes as a possible regulator of membrane-bound enzymes // Eur. J. Biochem.—1979.—94, N 1.—P. 99—107.
11. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков.—Киев: Наук. думка, 1988.—277 с.
12. Сунгуров А. Ю. Радиационная биология клеточной поверхности // Итоги науки и техники.—М.: ВИНТИ, 1988.—178 с.—(Сер. Радиц. биология; Т. 7).
13. Аковев И. Г. Проблемы постлучевого восстановления.—М.: Атомиздат, 1970.—368 с.
14. Восстановление и репаративные механизмы в радиобиологии // Под ред. А. Г. Копляшикова.—М.: Атомиздат, 1972.—256 с.

Харьков. гос. ун-т

Получено 03.05.93