

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vosberg H. P. DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*— 1985.— 114, N 1.— P. 19—102.
2. Ikeda H. DNA topoisomerase-mediated illegitimate recombination // *DNA topology and its biological effects.*— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1990.— P. 341—359.
3. Wang J. C., Caron P. R., Kim R. A. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? // *Cell.*— 1990.— 62, N 3.— P. 403—406.
4. Ocheroff N. Biochemical basis for the interactions of type I and type II topoisomerases with DNA // *Pharm. Ther.*— 1989.— 41, N 2.— P. 223—241.
5. Fukata H., Fukasawa H. Isolation and partial characterization of two distinct DNA topoisomerases from Cauliflower inflorescence // *J. Biochem.*— 1982.— 91, N 2.— P. 1337—1342.
6. Руденко Г. Н. Выделение и характеристика двух различных ДНК-топоизомераз I типа из листьев *Pisum sativum* // *Молекуляр. биология.*— 1991.— 25, № 5.— С. 1316.
7. Руденко Г. Н. Растительная ДНК-топоизомераза II типа: выделение, характеристика и свойства // Там же.— № 4.— С. 1125—1135.
8. Ситайло Л. А. Хлоропластная ДНК-топоизомераза I типа из листьев гороха // *Биополимеры и клетка.*— 1991.— 7, № 4.— С. 97—103.
9. Carballo M., Gine R., Santos M., Puigdomenech K. Characterization of topoisomerases I and II activities in nuclear extracts during callogenesis in immature embryos in *Zea mays* // *Plant Mol. Biol.*— 1991.— 16, N 1.— P. 59—70.
10. Nolan J. M., Lee M. P., Wyckoff E., Hsieh T. Isolation and characterization of the gene encoding *Drosophila* DNA topoisomerase II // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1986.— 83, N 11.— P. 3664—3668.
11. Töpfer R., Matzeit V., Gronenborn B. et al. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions // *Nucl. Acids Res.*— 1987.— 15, N 14.— P. 5890.
12. Koncz C., Schell J. The promoter of T1-DNA gene 5 controls the tissues-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector // *Mol. and Gen. Genet.*— 1986.— 204, N 3.— P. 383—396.
13. Манитис Т., Фрич Е. Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 521 с.
14. Гловер Д. Клонирование ДНК.— М.: Мир, 1988.— 538 с.
15. Horsch R. B., Fry J. E., Hoffman N. L. et al. A simple and general method for transferring genes into plants // *Science.*— 1985.— 227, N 4691.— P. 1229—1231.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.*— 1962.— 15, N 4.— P. 473—497.
17. Murray M. J., Thompson W. E. Rapid isolation of high molecular weight DNA // *Nucl. Acids Res.*— 1980.— 8, N 19.— P. 4321—4325.
18. Kirk M. M., Kirk L. D. Translation regulation of protein synthesis, in response to light at a critical stage of *Volvox* development // *Cell.*— 1985.— 41, N 2.— P. 419—428.
19. Church G. M., Gilbert W. Genomic sequencing // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1984.— 81, N 7.— P. 1991—1995.
20. Feinberg A. P., Volgenstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.*— 1984.— 137, N 5.— P. 266—267.
21. Hsieh T. Purification and properties of type II DNA topoisomerase from embryos of *D. melanogaster* // *Meth. Enzymol.*— 1983.— 100.— P. 161—170.
22. Wang J. C. Recent studies of DNA topoisomerases // *Biochim. et biophys. acta.*— 1987.— 909, N 1.— P. 1—9.
23. Rottman M., Schroder H. C., Gramasov M. et al. Specific phosphorylation of proteins in pore complex laminal aggregation factor and phorbol ester // *EMBO J.*— 1987.— 6, N 13.— P. 3939—3944.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН Украины, Киев

Получено 21.07.92

УДК 577.391

В. И. Древаль

ПОСТРАДИАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ТИМОЦИТОВ

Крыс облучали в дозах 1,5; 4,0; 7,0 и 10,0 Гр. Спустя 1, 8, 15, 22 и 30 сут в тимоидах определяли связывание 1-анилинонафталин-8-сульфоната, вязкость липидов и константу Штерна—Фольмера для белков плазматических мембран. Установлено, что для процесса пострадиационных изменений характерна фазовая периодичность структурных перестроек плазматических мембран.

Введение. В настоящее время успешно развиваются исследования, направленные на расшифровку механизма интерфазной гибели клеток, лежащей в основе клеточного опустошения кроветворной системы при

© В. И. Древаль, 1993

ISSN 0233-7657. БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. 1993. Т. 9. № 1

31

лучевой болезни [1, 2]. Многие из этих работ связаны с изучением тимуса — центрального органа иммунной системы, в котором происходит созревание и дифференцировка лимфоцитов [3, 4]. Существующие экспериментальные данные указывают на то, что в реализации гибели клеток под действием радиации участвуют процессы, связанные с изменением структуры мембран [5]. Среди различных типов мембран в функционировании клетки важное место принадлежит плазматической мембране, выполняющей роль не только барьера, отделяющего содержимое клетки от внешней среды, но и осуществляющей клеточную рецепцию, участвующую в построении мультиферментных комплексов и поддерживающую клеточный гомеостаз [6]. В связи с этим представляло интерес исследовать изменения структуры липидного и белкового компонентов плазматических мембран тимоцитов облученных животных в пострadiационный период.

Материалы и методы. Крыс-самцов линии «Вистар» массой 100—120 г облучали на ускорителе электронов энергией 5 МэВ в дозах 1,5; 4,0; 7,0 и 10 Гр. Спустя 1, 8, 15, 22 и 30 сут подопытных и контрольных (не подвергавшихся облучению) животных декапитировали. Тимус очищали и мелко измельчали ножницами в ледяной среде Хенкса (без кальция). Измельченный тимус пропускали несколько раз шприцем через иглу диаметром 2 мм до получения однородной суспензии и фильтровали через 6 слоев капрона. Клетки осаждали центрифугированием при 250 *g* в течение 10 мин и дважды промывали средой Хенкса с последующим переосаждением. Количество погибших тимоцитов, определенное в камере Горяева по тесту прокрашивания 0,2 %-м раствором трипанового синего, не превышало 2 % количества выделенных клеток. Концентрацию тимоцитов ($C_{кл}$) устанавливали при длине волны 570 нм в кювете с толщиной слоя 1 см [7]:

$$C_{кл} \approx 2,5 \cdot 10^7 \cdot E \text{ (} 10^7 \text{ клеток в 1 мл)}.$$

Связывание флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) с тимоцитами изучали на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-2A» (Япония) по методу [8].

Микровязкость липидов плазматических мембран тимоцитов определяли по степени эксимеризации флуоресцентного зонда пирена — F_m/F_s (где F_m — интенсивность флуоресценции мономеров, F_s — интенсивность флуоресценции эксимеров пирена) для анулярных и свободных липидов [9].

Константу Штерна — Фольмера (K_{sv}) для тушения белковой флуоресценции акриламидом находили при $\lambda_{возб} = 285$ нм и $\lambda_{фл} = 330$ нм. Концентрацию акриламида варьировали в пределах 0,08—0,38 М. Величину K_{sv} рассчитывали по формуле:

$$F_1/F_2 = 1 + K_{sv} [Q],$$

где F_1 и F_2 — интенсивности флуоресценции белков в отсутствие тушителя и при концентрации тушителя $[Q]$ [10].

Статистическую обработку данных [11] с использованием *t*-критерия Стьюдента и расчеты коэффициента корреляции (r) осуществляли на ЭВМ «Искра-1030».

Результаты и обсуждение. Для характеристики структурных изменений липидов и белков плазматических мембран тимоцитов исследовали связывание АНС с поверхностью клеток, изучали микровязкость липидной компоненты мембраны с помощью флуоресцентного зонда пирена; о динамике структуры белков плазматических мембран судили по тушению флуоресценции белков внешним тушителем.

Результаты определения микровязкости анулярных и свободных липидов (на расстоянии свыше 3 нм от интегральных белков) приведены в табл. 1 и 2. Обращает на себя внимание тот факт, что при всех колебаниях вязкости липидов в пострadiационный период вязкость анулярных липидов выше таковой свободных липидов. Следует также отметить фазный характер изменения вязкости, о чем уже сообщалось

ранее [12]. Можно выделить общую тенденцию изменения вязкости липидной компоненты плазматических мембран — повышение этого показателя как в анулярных, так и свободных липидах в первые же сутки после воздействия радиации на животных. Вместе с тем, если вязкость анулярных липидов начинает снижаться уже к 8-м сут после облучения, то вязкость свободных липидов — только к 15-м. Как для свободных, так и для анулярных липидов к 30-м сут после воздействия радиации вязкость снижается до контрольного уровня. Расчеты величины коэффициента корреляции показывают, что имеет место тесная взаимосвязь изменения вязкости анулярных и свободных липидов при облучении животных дозами 1,5 и 4,0 Гр ($r=0,081$ и $0,97$ соответственно), но величина коэффициента корреляции снижается при дозах 7,0 и 10,0 Гр ($r=0,68$ и $0,54$).

Результаты определения константы (K_a) и числа мест (N) связывания АНС с плазматическими мембранами тимоцитов приведены в табл. 3 и 4. Здесь также можно отметить фазность в изменениях как K_a , так и N , что подтверждает полученные ранее данные [13]. После воздействия ионизирующего излучения в различных дозах на животных величина K_a в целом имеет тенденцию к возрастанию на 8-е сут после облучения и в дальнейшем к 30-м сут снижается до контрольного уровня (см. табл. 3). Анализ показывает (см. табл. 4), что число мест связывания АНС возрастает в первые же сутки после облучения, снижаясь к 15-м сут по сравнению с необлученными и к 30-м — возвращаясь к контрольному уровню. Исследование изменений K_a и N в пострадиационный период выявило отрицательную корреляцию ($r=-0,61$) при дозе 1,5 Гр, тесную при 4,0 Гр ($r=0,82$) и отсутствие таковой при 7,0 и 10,0 Гр.

Для регистрации конформационных изменений белков плазматических мембран тимоцитов определяли константу Штерна — Фольмера при тушении акриламидом триптофановой флюоресценции мембранных белков [10, 14]. Очевидно, наблюдаемые изменения величины K_{SV} (табл. 5) свидетельствуют об изменении доступности как поверхностных, так и скрытых остатков триптофана акриламиду, что является

Таблица 1

Пострадиационные изменения вязкости анулярных липидов плазматических мембран тимоцитов крыс (F_M/F_0 , $M \pm m$)

Доза облучения, Гр	Контроль	Время после облучения, сут				
		1	8	15	22	30
1,5	1,22±0,11	2,14±0,19*	2,59±0,23*	1,49±0,13*	0,97±0,09*	1,07±0,10
4,0	1,22±0,11	2,26±0,20*	2,59±0,23*	1,61±0,15*	1,37±0,12	1,04±0,09
7,0	1,22±0,11	2,57±0,23*	1,72±0,16*	1,18±0,11	1,62±0,15*	1,40±0,13
10,0	1,22±0,11	3,16±0,28*	1,05±0,09	1,04±0,09	1,71±0,15*	1,59±0,14*

Примечание. Здесь и в табл. 2—5 звездочкой отмечены отличия, достоверные по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Таблица 2

Пострадиационные изменения вязкости несвязанных с белками липидов плазматических тимоцитов крыс (F_M/F_0 , $M \pm m$)

Доза облучения, Гр	Контроль	Время после облучения, сут				
		1	8	15	22	30
1,5	1,09±0,09	1,51±0,12*	2,09±0,17*	1,16±0,16*	0,85±0,07*	0,85±0,07*
4,0	1,09±0,09	1,78±0,15*	2,25±0,19*	1,54±0,14*	1,28±0,11	0,96±0,08
7,0	1,09±0,09	1,98±0,16	1,36±0,19	1,02±0,10	1,43±0,12*	1,09±0,08
10,0	1,09±0,09	2,48±0,20*	0,82±0,20*	0,82±0,07*	1,59±0,14*	1,24±0,10

следствием перестроек структуры мембранных белков [10, 14]. Обращает на себя внимание близость динамики изменений K_{SV} для животных, облученных при различных дозах. Это может указывать на одни и те же сдвиги свойств белков плазматических мембран тимоцитов. В целом следует отметить тенденцию к снижению K_{SV} к 30-м сут после воздействия радиации на животных по сравнению с контролем.

Таблица 3

Пострадиационные изменения константы связывания ($K_a \cdot 10^{-3}$, μM^{-1}) АНС с тимоцитами крыс ($M \pm m$)

Доза облучения, Гр	Контроль	Время после облучения, сут				
		1	8	15	22	30
1,5	62,9±10,8	67,9±11,7	62,6±10,4	87,5±13,6*	72,2±13,9	62,3±10,6
4,0	62,9±10,8	101,2±17,7*	72,2±12,3	62,5±10,7	77,2±13,2	64,9±11,4
7,0	62,9±10,8	85,5±14,7	131,4±22,5*	77,8±13,3	87,5±12,9*	69,8±12,0
10,0	62,9±10,8	78,5±13,7	174,0±28,7*	86,1±12,2*	96,8±16,2*	80,5±13,8

Таблица 4

Пострадиационные изменения числа мест связывания АНС с плазматическими мембранами тимоцитов крыс ($F_{отн.ед} \cdot 10^7$ клеток), ($M \pm m$)

Доза облучения, Гр	Контроль	Время после облучения, сут				
		1	8	15	22	30
1,5	89,6±6,9	97,5±7,5	104,6±7,9*	88,7±6,8	89,6±6,7	104,8±8,1*
4,0	89,6±6,9	110,2±8,5*	86,0±6,6	81,5±6,3	95,4±7,3	96,8±7,5
7,0	89,6±6,9	120,1±9,2*	85,8±6,6	80,6±6,2	96,8±7,5	86,9±6,7
10,0	89,6±6,9	129,0±9,9*	108,4±8,3*	64,5±4,6*	100,4±7,3	71,7±5,2*

Таблица 5

Пострадиационные изменения константы Штерна — Фольмера (K_{SV}) для белков плазматических мембран тимоцитов крыс ($M \pm m$)

Доза облучения, Гр	Контроль	Время после облучения, сут				
		1	8	15	22	30
1,5	4,91±0,23	4,86±0,19	5,05±0,15	5,06±0,30	5,01±0,25	4,62±0,14
4,0	4,91±0,23	4,86±0,19	4,57±0,18	4,91±0,29	5,06±0,15	4,52±0,23
7,0	4,91±0,23	5,01±0,15	4,66±0,14	4,66±0,19	5,16±0,21	4,42±0,25*
10,0	4,91±0,23	5,35±0,20*	5,06±0,30	4,52±0,14	5,35±0,20*	4,32±0,26*

Полученные данные позволяют заключить, что для процесса пострадиационных изменений тимуса характерна фазовая периодичность структурных модификаций плазматических мембран. Это подтверждает имеющиеся данные о фазном характере реакции клеток на внешние воздействия [15]. Нормализация изученных характеристик структурного состояния плазматических мембран тимоцитов к 30-м сут после облучения животных может, в принципе, отражать реальную эффективность репарационных систем организма. Очевидно, зарегистрированные изменения структуры плазматических мембран тимоцитов характеризуют процессы восстановления организма после острого лучевого поражения, при котором происходит восполнение убыли популяции клеток критических органов и восстановление их функциональной активности [16].

Summary. The rats were irradiation at doses 1,5; 4,0; 7,0 and 10,0 Gr. After 1, 8, 15, 22 and 30 days in thymocytes was determine binding 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate, viscosity lipids and constant Shlern—Folmer for proteins by plasma membranes. Was place, that for process postradiation changes of thymocytes characteristic phase periodical structural changes plasma membranes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров Р. В., Зарецкая Ю. М. Радиационная иммунология и трансплантация.— М.: Атомиздат, 1970.— 554 с.
2. Ярилин А. А. Клеточные основы действия радиации на иммунитет // Современ. пробл. радиобиологии.— М., 1980.— С. 86—98.
3. Петров Р. В. Иммунология острого лучевого поражения.— М.: Медицина, 1962.— 240 с.
4. Романцев Е. Ф. Радиационная биохимия тимуса.— М.: Атомиздат, 1972.— 170 с.
5. Поливода Б. И., Конев В. В., Попов Г. А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран.— М.: Энергоатомиздат, 1990.— 160 с.
6. Кагава Я. Биомембраны.— М.: Высш. шк., 1985.— 303 с.
7. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов.— М.: Наука, 1989.— 270 с.
8. Agüero R. M., Pico G., Guibert E., Corehs J. L. 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.
9. Лигонин И. С., Образцов В. В. Изучение вязкости свободных и связанных с белками липидов в мембранах // Биофизика.— 1982.— 27, № 1.— С. 81—85.
10. Ликович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
11. Зикс Л. Статистическое оценивание.— М.: Статистика, 1976.— 598 с.
12. Сунсуров А. Ю. Радиационная биология клеточной поверхности // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1988.— 178 с.— (Сер. Радиц. биология; Т. 7).
13. Фоменко Б. С., Акоев И. Г. Структурные изменения плазматических мембран под действием ионизирующей радиации // Успехи современ. биологии.— 1982.— 93, № 2.— С. 183—193.
14. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков.— Киев: Наук. думка, 1988.— 227 с.
15. Александров В. Я. Реактивность клетки и белки.— Л.: Наука, 1985.— 318 с.
16. Стрелин Г. С., Ярмоненко С. П. Процессы восстановления в облученном организме // Пострадиаци. репарация / Под ред. В. П. Парибока.— М.: Атомиздат, 1970.— С. 264—335.

Харьков. гос. ун-т

Получено 15.04.92

УДК 577.37

**В. Д. Крушин, С. А. Курилко,
В. Н. Ткаченко, Г. П. Горбенко, В. В. Товстяк**

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ СПОСОБНОСТЬ СВЯЗЫВАТЬ 1,8-АНИЛИНОНАФТАЛИНСУЛЬФОНАТ

Исследовано действие ультразвука на электрокинетические свойства тимоцитов крысы. Установлено, что озвучивание сопровождается уменьшением электрофоретической подвижности клеток. Предполагается, что наблюдаемый эффект обусловлен изменением распределения заряженных групп на клеточной поверхности.

Введение. Одним из важных аспектов влияния ультразвука на биологические структуры является модификация физико-химических свойств клеточных мембран [1—3]. К настоящему времени выявлены основные закономерности действия ультразвуковых волн на структурно-функциональное состояние биомембран. Показано, что ультразвук может изменять ионную проводимость липидного бислоя [4, 5], пространствен-

© В. Д. Крушин, С. А. Курилко, В. Н. Ткаченко, Г. П. Горбенко, В. В. Товстяк, 1993