



УДК 619:615:577.1:616-003.269:636

© 2007

Академік НАН України **Д. О. Мельничук, В. А. Грищенко,  
С. В. Хижняк, О. О. Кисіль, В. М. Войціцький**

**Структурно-динамічні властивості апікальної мембрани  
ентероцитів кишечника телят за ентеропатології  
та комплексної терапії із застосуванням  
фосфоліпидовмісної БАД**

*We have found changes in the physical, structural, and dynamic properties of the apical membrane of intestine enterocytes of 1-month-old calves' which had been ill with neonatal dyspepsia. An effective impact of complex therapy using a biologically active additive with reparative function on the base of milk phospholipids for the correction of the available data is shown.*

Провідна концепція сучасної патології ґрунтується на визнанні важливої ролі структурно-функціональної дестабілізації клітинних мембран унаслідок пероксидного окиснення ліпідів та фосфоліпидного гідролізу в патогенезі запальних, дистрофічних і дегенеративних процесів [1]. На сьогодні вже доведено ключову роль порушень ліпідного бішару мембран у розвитку важких захворювань печінки, серцево-судинної та нервової систем, розладів багатьох функцій клітин крові, епітелію тощо, що в гуманній медицині передбачає застосування фосфоліпидовмісних засобів репаративної дії [2]. У цьому сенсі створена біологічно активна добавка (БАД) на основі фосфоліпідів молока, дешевою та доступною сировиною для отримання яких є маслянка (побічний продукт переробки молока на масло).

У цьому повідомленні наведено результати дослідження впливу комплексної схеми застосування БАД на основі фосфоліпідів молока на інтенсивність відновлення фізичних та структурно-динамічних характеристик апікальної мембрани ентероцитів кишечника телят, які перехворіли на неонатальну диспепсію.

Для проведення експериментальних досліджень з телят дводобового віку було сформовано три дослідні групи по шість голів у кожній. I група (контрольна) включала телят, які залишались клінічно здоровими впродовж першого місяця життя. Телята II і III груп хворіли на токсичну форму диспепсії, починаючи з другої доби життя. Тварин II групи лікували за традиційною терапевтичною схемою, тварин III групи лікували комплексно (традиційна терапія + БАД) до зникнення клінічних ознак захворювання, їм продовжували давати БАД до 30-добового віку включно. Традиційна схема лікування тварин включала застосування

фармакопейних препаратів тремексину і тиломіцину В, згідно з існуючими інструкціями щодо їх використання, та нутрил Se (вітамінно-амінокислотна добавка із селеном) [3]. БАД у період захворювання телят на диспепсію вводили з молоком по 3 капсули три рази на добу, а в період реабілітації і до 30-добового віку — по 5 капсул один раз на добу із розрахунку (відповідно кількості капсул) 0,04–0,06 г ліпідної суміші/кг маси тіла тварини за один прийом. Розроблена на кафедрі біохімії тварин, якості і безпеки сільськогосподарської продукції в Національному аграрному університеті фосфоліпидовмісна БАД FLР-MD (лікарська форма — капсули) являє собою суміш різних класів фосфоліпідів, виділених з маслянки [4]. Основними фосфоліпідами мембран жирових глобул молока є фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін і сфінгомієлін, на частку яких доводиться більше 80% загального ліпідного фосфору.

На 30-ту добу постнатального періоду телят забивали і відбирали зразки порожньої кишки. Препарати апікальних мембран одержували з гомогенату клітин епітелію слизової оболонки порожньої кишки за методом [5] без очищення на градієнті сахарози. Вміст загального білка визначали методом [6]. Усі препарати характеризувалися достатнім ступенем чистоти як описано в роботі [7]. Структурно-динамічні властивості мембранних препаратів ентероцитів вивчали за допомогою флуоресцентних зондів, які локалізуються в різних ділянках мембрани: 1-анілінонафталін-8-сульфонату (АНС) — переважно на поверхні мембранного бішару, пірену — у зоні жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів [8]. Конформаційний стан білкових молекул у мембранах оцінювали за ефективністю гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції як описано в [9]. Ефективність індуктивно-резонансного перенесення енергії (ІРПЕ) в донорно-акцепторних парах у разі їхньої різної локалізації в мембрані визначали згідно з рекомендаціями [10]. Усі вимірювання абсорбції проводили на спектрофлуориметрі Shimadzu-RF510 (Японія) у кварцових односантиметрових кюветках при 25 °С. Результати експериментальних досліджень обробляли загальноприйнятими методами статистики.

У результаті проведених досліджень встановлено зниження інтенсивності флуоресценції АНС, зв'язаного з мембранними препаратами, в усіх дослідних групах у середньому на 15–20% відносно контрольних значень. Оскільки майже вся вимірювана флуоресценція АНС зумовлена тільки флуоресценцією зв'язаного зонда, це дає можливість за результатами флуоресценції визначати параметри його зв'язування з мембраною: константу зв'язування ( $K_{АНС}$ ) і кількість місць зв'язування ( $N_{АНС}$ ) (табл. 1). Встановлено, що для мембранних препаратів II групи тварин величина  $K_{АНС}$  збільшується на 21%, а  $N_{АНС}$  вірогідно зменшується на 14% відносно контрольних значень. Водночас для мембранних препаратів III групи лише  $N_{АНС}$  вірогідно зменшується на 16% відносно контрольних значень.

Таким чином, для мембранних препаратів III групи зниження інтенсивності флуоресценції АНС, імовірно, зумовлене зменшенням кількості місць зв'язування зонда. Структурна модифікація мембран препаратів від тварин II групи обумовлена як зниженням кількості центрів зв'язування АНС, так і зміною їх властивостей. Зміни константи асоціації зонда та кількості місць зв'язування АНС з мембраною є відображенням інтегральних процесів (зміни мікрооточення зонда, поверхневого заряду, структурних перебудов тощо), які відбуваються в мембрані, оскільки флуоресценція АНС значно залежить від його складу [8]. Зважаючи на те що молекула АНС локалізується в полярній області мембрани, утворюючи комплекси з білковими та ліпідними молекулами, отримані результати вказують на модифікацію поверхневої структури мембрани, причому за умов лікування БАД такі зміни менш виражені.

Дослідження мікров'язкості ліпідної компоненти мембран проводили з використанням флуоресцентного зонда пірену, гідрофобні молекули якого локалізуються в зоні жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів. Враховуючи, що ексімеризація пірену — дифузно контролюючий процес, що може характеризувати мікров'язкість в оточенні зонда [11], оцінювали в'язкість загальної ліпідної фази ( $N_{335}$ ) та анулярних ліпідів ( $N_{280}$ ). За умов досліду лише в мембранних препаратах телят II групи спостерігалось підвищення показника  $N_{335}$  на 16% та  $N_{280}$  на 10% відносно контрольних значень, що свідчить про зменшення мікров'язкості ліпідної фази та анулярних ліпідів. Ступінь ексімеризації пірену в мембранних препаратах тварин III групи практично не змінювався. Отримані дані вказують на порушення структурної впорядкованості ліпідної компоненти мембран у тварин II групи і на її нормалізацію при застосуванні БАД у тварин III групи.

Для оцінки структурних змін білкової компоненти мембран досліджували інтенсивність флуоресценції триптофанових залишків білкових молекул, яка може бути пов'язана з конформаційними перебудовами, внутрішньомолекулярною динамікою білків та характером взаємодії триптофанових залишків з сусідніми групами, оскільки флуоресценція триптофанів чутлива до рухомості сусідніх груп тощо [9]. Встановлено, що в мембранних препаратах телят II і III груп інтенсивність флуоресценції триптофанових залишків білкових молекул не змінюється в порівнянні з контролем (див. табл. 1).

Для оцінки конформаційних змін мембранних білків вивчали гасіння триптофанової флуоресценції зовнішнім нейтральним полярним гасником — акриламідом. Аналіз даних свідчить про те, що кількість триптофанових залишків, які піддаються гасінню за умов досліду, істотно не змінюється. Водночас величина ефективної константи гасіння ( $K_{SV}$ ) зменшується для телят II та III груп відповідно на 33 і 42% відносно контрольних значень (див. табл. 1). Оскільки зміни  $K_{SV}$  відображають внутрішньомолекулярну динаміку білкових молекул, то зниження  $K_{SV}$  може бути зумовлено зростанням структурної жорсткості мембранних білків [12]. Згідно з отриманими результатами, в мембранних препаратах телят II та III груп має місце модифікація білкових молекул, яка обумовлена зменшенням їх внутрішньомолекулярної динаміки.

Таблиця 1. Показники структурно-динамічних властивостей апікальної мембрани ентероцитів тонкої кишки ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Показник	I група (контроль)	II група	III група
Спектральні характеристики флуоресцентного зонда АНС			
Константа зв'язування ( $K_{АНС}$ ), $\text{мкМ}^{-1}$	$6,14 \pm 0,35$	$7,43 \pm 0,43^*$	$5,77 \pm 0,42$
Кількість місць зв'язування ( $N_{АНС}$ ), нмоль/мг білка	$8,25 \pm 0,45$	$7,09 \pm 0,42^*$	$6,97 \pm 0,43^*$
Ступінь ексімеризації пірену			
Загальна ліпідна фаза ( $N_{335}$ )	$37,0 \pm 1,0$	$42,8 \pm 1,1^*$	$38,5 \pm 1,0$
Анулярні ліпіди ( $N_{280}$ )	$33,0 \pm 0,9$	$36,2 \pm 1,0^*$	$32,2 \pm 1,1$
Триптофанова флуоресценція білкових молекул			
Триптофанова флуоресценція, відн. од.	$1,00 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,07$	$1,07 \pm 0,05$
Константа Штерна-Фольмера ( $K_{SV}$ ), $\text{М}^{-1}$	$2,07 \pm 0,15$	$1,38 \pm 0,11^*$	$1,21 \pm 0,12^*$
Ефективність індуктивно-резонансного перенесення енергії			
Триптофан — пірен	$1,00 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,04^*$	$0,97 \pm 0,04$
Триптофан — АНС	$1,88 \pm 0,06$	$2,23 \pm 0,07^*$	$1,71 \pm 0,06$

\*  $P \leq 0,05$ , дані вірогідні порівняно зі значеннями у тварин I групи (контролі).

Основу структурної та функціональної цілісності біологічної мембрани складають білок-ліпідні взаємодії. Просторову організацію білок-ліпідних комплексів в досліджуваних мембранах оцінювали за допомогою методу ІРПЕ у парі флуорофорів донор — акцептор (триптофан — пірен та триптофан — АНС) [8, 14]. При аналізі результатів ІРПЕ враховували, що найбільш вірогідні місця локалізації триптофанових залишків — це гідрофобні ділянки білків, флуоресцентний зонд АНС переважно локалізується в мембрані на межі розподілу ліпід — вода, пірен — у зоні жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів [14].

У зв'язку з тим, що клітинні мембрани — це складно організовані білок-ліпідні системи, усі донори умовно поділяються на дві групи: 1) донори, які знаходяться від акцептора на відстані, меншій за критичну, і, відповідно, беруть участь у перенесенні енергії; 2) донори, які віддалені на відстань, більшу за критичну, і не підлягають гасінню акцептором. За результатами гасіння флуоресценції донора акцептором розраховували частку залишків донора, доступних гасінню акцептором, та величину  $F_0 - F/F_0$  (де  $F_0$  — інтенсивність флуоресценції за відсутності гасника,  $F$  — у присутності гасника), яка свідчить про ефективність ІРПЕ [10].

Встановлено, що в мембранних препаратах для всіх донорно-акцепторних пар частка молекул донора, доступних гасінню акцептором, не змінюється. В мембранних препаратах тварин II групи величина  $F_0 - F/F_0$  вірогідно знижується на 33% відносно контролю в парі триптофан — пірен, що свідчить про зниження ефективності перенесення енергії (див. табл. 1). За ефективністю гасіння піреном триптофанової флуоресценції можна оцінити ступінь занурення білків у ліпідну фазу мембран, тобто зниження ефективності ІРПЕ за даних умов більшою мірою зумовлено переміщенням білкових молекул у гідрофільну фазу чи їх агрегацією [8, 13].

Дослідження ІРПЕ у парі триптофан — АНС показало, що величина  $F_0 - F/F_0$  збільшується також лише в препаратах телят II групи (на 19% відносно контролю). Підвищення ефективності ІРПЕ у парі флуорофорів свідчить про зменшення відстані між ними. Оскільки критична відстань ІРПЕ для пари триптофан — АНС дорівнює 2,0–3,5 нм, а товщина мембрани — близько 4,0 нм, то більш істотний внесок у перенесення енергії здійснюють флуорофори, розташовані з одного боку мембрани по відношенню до ліпідної фази [13]. Наведені дані, поряд з результатами дослідження параметрів зв'язування АНС з мембраною, свідчать про структурну модифікацію поверхневих ділянок мембран ентероцитів, отриманих від тварин, яких лікували за традиційною схемою.

Таким чином, за умов традиційного лікування відбуваються різнобічні деструктивні зміни мембран ентероцитів тонкої кишки, а саме: модифікація поверхневої структури мембран, зменшення структурної впорядкованості ліпідної компоненти і порушення гідрофобних білок-ліпідних взаємодій та конформаційна модифікація білкових молекул. Проте в мембранних препаратах телят, що отримували БАД, відмічаються лише конформаційні зміни білкових молекул у порівнянні з контролем. Тобто комплексне лікування із включенням фосфоліпидовмісної БАД репаративної дії приводить до нормалізації показників, що характеризують структурний стан апікальної мембрани, особливо ліпідної компоненти.

1. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — Москва: Наука, 1972. — 256 с.
2. *Gundermann K.-J.* Эссенциальные фосфолипиды в гепатологии: экспериментальный и клинический опыт // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 1997. — № 2. — С. 94.
3. *Субботин В. М., Субботина А. Л., Александров И. Д.* Современные лекарственные средства в ветеринарии. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. — 594 с.

4. Пат. № 1289440 А1 СССР, А 61 К37/22. Способ получения фосфолипидов / Д. А. Мельничук, В. К. Лишко, А. В. Стефанов, В. Н. Кириленко и др. – Заявл. 23.01.85; Оpubл. 15.02.87.
5. Усатюк П. В., Мельничук Д. О. Отримання апікальних та базолатеральних мембран епітелію тонкого кишечника. Методичні аспекти // Укр. біохім. журн. – 1995. – **67**, № 5. – С. 16–24.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. F., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, No 1. – P. 265–275.
7. Цвильховський Н. И., Усатюк П. В., Мельничук Д. А. Выделение, очистка и характеристика щеточной каймы и базолатеральных мембран из клеток кишечного эпителия крупного рогатого скота // Укр. биохим. журн. – 1988. – **60**, № 6. – С. 91–94.
8. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. – Москва: Наука, 1989. – 277 с.
9. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков. – Киев: Наук. думка, 1988. – 280 с.
10. Фоменко Б. С., Длмбетова Г. К., Акоев И. Г. Индуктивно-резонансный перенос энергии между хромофорами, локализованными в разных участках облученных и необлученных теней эритроцитов // Радиобиология. – 1985. – **25**, № 1. – С. 12–15.
11. Литвинов И. С., Образцов В. В. Изучение вязкости свободных и связанных с белком липидов в мембранах // Биофизика. – 1982. – **26**, вып. 1. – С. 81–85.
12. Лактович Дж. Основы флуоресценции спектроскопии. – Москва: Мир, 1986. – 236 с.
13. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – Москва: Наука, 1980. – 320 с.
14. Шустанова Т. А., Милюткина Н. П., Бондаренко Т. И. Биологические мембраны. – 2001. – **18**, № 5. – С. 375–381.

Національний аграрний університет, Київ  
 Київський національний університет  
 ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 08.11.2006

УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

© 2007

Член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько, В. В. Пушкарьов,  
 О. І. Ковзун, В. М. Пушкарьов

## Стимуляція протипухлинним препаратом таксоллом клітинного циклу (G1/S перехід) в клітинах анапластичного раку щитовидної залози

*The effect of antitumor drug, taxol, on the activity of cell cycle regulatory factors in two cell lines of anaplastic thyroid cancer ARO and KTC-2 is studied. It is shown that taxol enhances the phosphorylation of retinoblastoma protein, pRB, in both cell lines. The taxol addition to the incubation medium in 6 h of incubation induced a significant decrease of the level of the inhibitor of cyclin-dependent kinases (CDK) and G1/S progression – p27<sup>KIP1</sup>. The level of another CDK inhibitor, p21<sup>waf1</sup>, was also decreased but after 12 h of incubation. These results indicate that the low concentration of taxol stimulates the early cell cycle stages in thyroid anaplastic cancer cells.*

Анапластичний рак щитовидної залози (ЩЗ) є досить рідкою (до 10% від усіх злоякісних новоутворень щитовидної залози), але найбільш агресивною формою раку людини з поганим прогнозом [1, 2].