



УДК 577.115.346:616.341

© 2012

Л. І. Степанова, Л. В. Грубська, С. В. Хижняк, В. М. Войціцький

Цитохроми дихального ланцюга мітохондрій ентероцитів тонкої кишки щурів при дії іонізуючої радіації

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

Проведено дослідження вмісту комплексів цитохромів та убіхінону у внутрішній мембрані мітохондрій клітин слизової оболонки тонкої кишки щурів при разовій дії іонізуючого випромінювання низької потужності (0,055 Гр/хв). Виявлені кількісні зміни вмісту цитохромів груп b, c, a та зменшення вмісту убіхінону в мітохондріальній мембрані після дії іонізуючої радіації в дозах 0,1, 0,5, 1,0 Гр через 1, 12, 24 год після опромінення, що може зумовити модифікацію функціональних властивостей мітохондрій.

Серед різноманітності забруднювачів навколишнього середовища, які значно впливають на біосферу, необхідно виділити насамперед дію іонізуючої радіації [1]. Враховуючи високу здатність біологічних мембран до радіаційно-індукованого окиснення, відзначається структурна модифікація біологічних мембран та порушення їх функціональних властивостей при дії іонізуючої радіації [2, 3].

Особливу увагу в радіобіології привертає стан органів, мембранних структур та процесів, що мають вирішальне значення в розвитку радіаційного пошкодження організму. Тонка кишка є одним із найбільш радіочутливих органів, що значною мірою визначається високоспеціалізованою структурою епітеліальних клітин — ентоцитів. Енергетичне забезпечення процесів всмоктування та перетворення речовин у клітинах тонкої кишки (ентоцитах) в основному забезпечується мітохондріями. Основною системою перетворення енергії в мітохондріях є дихальний ланцюг — система комплексів, що вбудована у внутрішню мембрану мітохондрій. При його функціонуванні відбувається послідовне окиснення та відновлення редокс-систем комплексів, що забезпечує процес спряження окиснення та фосфорилування.

Метою даної роботи було визначення вмісту цитохромів груп b, c, a та убіхінону (CoQ) внутрішньої мембрани мітохондрій клітин слизової оболонки тонкої кишки щурів при разовій дії іонізуючого випромінювання низької потужності.

Матеріали та методи досліджень. У дослідах використовували білих безпорідних щурів-самців масою 180–200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Разове опромінення тварин проводили на установці РУМ-17 з тубусом у дозах 0,1, 0,5 й 1,0 Гр за таких умов: потужність дози 0,055 Гр/хв, фільтри 0,5 мм Cu та 1,0 мм Al, сила струму 5 мА, напруга 200 кВ, шкірно-фокусна відстань 100 см. Тварин декапітували через 1, 12, 24 год після дії іонізуючої радіації.

Об'єкт досліджень — препарати внутрішньої мембрани мітохондрій (ВММ), які отримували у вигляді субмітохондріальних частинок методом диференційного центрифугування [4]. Чистоту препаратів оцінювали електронно-мікроскопічним та біохімічним методами (за активністю маркерних ферментів: 5'-нуклеотидази та сукцинатдегідрогенази). Концентрацію цитохромів груп *b*, *c*+*c*₁, *a*+*a*₃ визначали спектрофотометричним методом [5], а вміст убіхінону та редокс-стану (тобто % вмісту окисненої форми убіхінону від його загальної кількості в мітохондріях) — за методом, описаним у [6].

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики, достовірність відмінностей між показниками дослідної та контрольної груп оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення. У переносі електронів від КоQH₂ на кисень у процесі функціонування дихального ланцюга задіяна система цитохромів груп *b*, *c*, *a*. Вони мають простетичну гемінову групу, що містить залізо та білкові компоненти. При визначенні кількості цитохромів у досліджувані проби вносили субстрати дихального ланцюга — НАД · Н та сукцинат (відповідно I й II комплексів електронно-транспортного ланцюга).

Встановлено, що при внесенні субстратів як НАД · Н, так і НАД · Н та сукцинату концентрація цитохромів групи *b* в препаратах ВММ після дії іонізуючого випромінювання в дозі 0,1 Гр через 1, 12 й 24 год збільшується на 10–60% відносно контролю (табл. 1). Після дії іонізуючого випромінювання в дозі 0,5 Гр при внесенні НАД · Н вірогідно зростає концентрація цитохромів групи *b* через 1 год у середньому на 80%, а через 24 год після опромінення — на 52% відносно контролю. При внесенні НАД · Н та сукцинату спостерігаються такі зміни концентрації цитохромів групи *b*: через 1 й 24 год після опро-

Таблиця 1. Концентрація цитохромів (мкмоль цитохрому / мг білка) у препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій клітин слизової оболонки тонкої кишки після дії іонізуючої радіації ($M \pm m$, $n = 8$)

Умови досліджу	НАД · Н		НАД · Н + сукцинат	
	<i>c</i> + <i>c</i> ₁	<i>b</i>	<i>c</i> + <i>c</i> ₁	<i>b</i>
Контроль	32,0 ± 0,9	13,0 ± 0,3	89,9 ± 4,6	13,8 ± 0,8
Доза опромінення, 0,1 Гр:				
1 год	57,4 ± 4,5*	21,1 ± 1,5*	126,1 ± 7,1*	20,5 ± 1,0*
12 год	52,2 ± 4,3*	17,2 ± 1,1*	126,0 ± 6,8*	15,2 ± 0,6
24 год	67,0 ± 6,9*	15,2 ± 0,8*	182,2 ± 12,8*	10,4 ± 0,2*
Доза опромінення, 0,5 Гр:				
1 год	6,0 ± 0,24*	23,0 ± 1,3*	44,4 ± 4,6*	12,1 ± 0,4
12 год	6,2 ± 0,4*	12,3 ± 0,6	16,2 ± 1,7*	16,3 ± 0,8*
24 год	19,1 ± 0,9*	6,3 ± 0,1*	12,1 ± 0,8*	10,4 ± 0,3*
Доза опромінення, 1,0 Гр:				
1 год	16,0 ± 0,7*	18,1 ± 0,7*	65,4 ± 4,0*	18,4 ± 1,1*
12 год	16,0 ± 0,6*	86,1 ± 4,1*	41,3 ± 3,2*	15,0 ± 0,7
24 год	22,5 ± 1,2*	63,2 ± 3,8*	40,0 ± 3,4*	6,3 ± 0,1*

* $p \leq 0,05$ відносно контролю.

мінення концентрація зменшується в середньому на 13 й 25%, а через 12 год зростає на 18%.

Після опромінення в дозі 1,0 Гр при внесенні НАД·Н спостерігається збільшення кількості цитохромів групи *b* у препаратах ВММ через 1, 12 й 24 год у середньому на 39, 101 й 78% відповідно. Однак у присутності НАД·Н та сукцинату їх концентрація вірогідно зростає в середньому на 33% відносно контролю через 1 год після опромінення та знижується на 44% через 24 год, а через 12 год отримані значення досліджуваного показника відповідають контролю. Отже, у зв'язку з дією іонізуючої радіації низької потужності при запуску тільки I комплексу дихального ланцюга мітохондрій кількість цитохромів групи *b* у препаратах ВММ зростає (особливо при опроміненні в дозі 1,0 Гр), а при одночасному запуску I й II комплексів дихального ланцюга ці зміни виражені менше.

Встановлено, що внаслідок дії іонізуючої радіації в дозі 0,1 Гр збільшується концентрація цитохромів групи *c* у препаратах ВММ при внесенні субстратів як НАД·Н, так і НАД·Н та сукцинату в середньому на 40–100% в усіх досліджуваних термінах (див. табл. 1). При опроміненні в дозі 0,5 Гр спостерігається зменшення кількості цитохромів групи *c* у ВММ (при внесенні НАД·Н) через 1 та 12 год у середньому в 5 разів, а через 24 год на 61%. У присутності субстратів НАД·Н та сукцинату їх вміст через 1 год після опромінення знижується в середньому на 51% відносно контролю, а через 12 й 24 год на 85% відносно контролю. При опроміненні в дозі 1,0 Гр при внесенні субстратів НАД·Н та сукцинату їх вміст знижується в середньому на 30–50% відносно контролю (див. табл. 1). Отже, внаслідок дії іонізуючої радіації низької потужності в дозі 0,1 Гр кількість цитохромів групи *c* у препаратах ВММ зростає, а при збільшенні дози опромінення до 1,0 Гр — знижується (за наявності субстратів як I, так і II комплексів дихального ланцюга). Зменшення кількості цитохромів групи *c* в мітохондріях може свідчити про вихід цитохрому *c* у міжмембранний простір через пошкодження ВММ. Водночас, зростання їх кількості можна пояснити наявністю різних структурних станів цитохромів групи *c* в дихальному ланцюзі мітохондрій: одного — пов'язаного з сукцинатдегідрогеназною системою та діючого при окисненні сукцинату; другого — пов'язаного з окисненням інших субстратів (наприклад, аскорбату) [7]. Тобто, розподіл цитохромів групи *c* у ВММ зі зниженням дози опромінення може відбуватися в бік збільшення частки цитохрому *c*, не пов'язаного із сукцинатдегідрогеназною системою.

Після опромінення тварин у дозах 0,1, 0,5, 1,0 Гр спостерігається вірогідне зниження концентрації цитохромів групи *a* + *a*₃ у препараті ВММ при внесенні субстрату НАД·Н, а з додаванням НАД·Н та сукцинату зниження відзначається у середньому 2 рази (табл. 2). За умов опромінення зменшується і активність цитохромоксидази [8], функціонування якої пов'язане з цитохромами групи *a*, що свідчить про пригнічення функціональної активності дихального ланцюга мітохондрій. Враховуючи роль ферменту в електронно-транспортному ланцюзі, виявлені зміни можуть призвести до нагромадження вільних радикалів кисню в мітохондріях [9].

Убіхінон — низькомолекулярна сполука, рухлива в ліпідному матриксі ВММ. Цей компонент дихального ланцюга мітохондрій не є білковим комплексом [10]. Головною функцією КоQ у внутрішній мембрані мітохондрій — є транспорт електронів та Н⁺ від субстрату НАД·Н та сукцинатдегідрогеназного комплексу до КоQ-цитохром-*c*-оксидоредуктази [11]. Встановлено, що опромінення щурів у досліджуваних дозах 0,1, 0,5, 1,0 Гр призводить до зниження вмісту убіхінону ВММ на 20–56% відносно контролю (табл. 3).

Убіхінон функціонує у внутрішній мембрані мітохондрій без значної зміни його редокс-стану, що дозволяє говорити про його регуляторно роль у дихальному ланцюзі міто-

хондрій. Зміна співвідношення убіхінон/убіхінол може зумовити модифікацію структурних і функціональних властивостей мембран [12]. Встановлено, що в умовах проведення досліджень при дії іонізуючого випромінювання в дозі 0,1 Гр редокс-стан убіхінон/убіхінол ВММ через 1 год після опромінення знижується в середньому на 31%, а через 24 год — підвищується на 21% відносно контролю, хоча через 12 год істотних змін цього показника не відзначено. При опроміненні в дозі 0,5 Гр виявлено достовірне підвищення досліджуваного показника через 1, 12 й 24 год у середньому на 13, 18 й 39% відповідно. Після опромінення в дозі 1,0 Гр відбувається вірогідне зростання редокс-стану убіхінону ВММ на 50–60% відносно контролю (див. табл. 3).

Аналіз отриманих результатів свідчить про зниження вмісту відновленого убіхінону, що можливо внаслідок порушення структури мембран мітохондрій та може вказувати на конформаційні зміни ферментів у місцях зв'язування з убіхіноном. Окиснені форми убіхі-

Таблиця 2. Концентрація цитохромів групи *a* (мкмоль цитохрому / мг білка) у препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій клітин слизової оболонки тонкої кишки після дії іонізуючої радіації ($M \pm m$, $n = 8$)

Умови досліджу	НАД · Н	НАД · Н + сукцинат
	$a + a_3$	$a + a_3$
Контроль	88,2 ± 4,9	83,1 ± 1,3
Доза опромінення, 0,1 Гр:		
1 год	33,0 ± 1,8*	56,6 ± 9,0*
12 год	51,1 ± 2,3*	43,3 ± 6,6*
24 год	87,0 ± 4,3	33,9 ± 5,4*
Доза опромінення, 0,5 Гр:		
1 год	83,3 ± 5,8	39,3 ± 0,5*
12 год	64,1 ± 5,1*	38,6 ± 2,3*
24 год	61,1 ± 4,9*	47,1 ± 4,5*
Доза опромінення, 1,0 Гр:		
1 год	78,0 ± 3,6*	28,8 ± 1,8*
12 год	72,1 ± 3,5*	32,2 ± 2,0*
24 год	59,2 ± 4,9*	40,1 ± 3,2*

* $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Таблиця 3. Вміст убіхінону в препаратах внутрішньої мембрани мітохондрій клітин слизової оболонки тонкої кишки після дії іонізуючої радіації ($M \pm m$, $n = 8$)

Умови досліджу	ω , мкмоль убіхінону / мг білка	Редокс стан, %
	Контроль	0,48 ± 0,031
Доза опромінення, 0,1 Гр		
1 год	0,29 ± 0,08*	25,8 ± 1,6*
12 год	0,36 ± 0,09*	39,2 ± 1,8
24 год	0,38 ± 0,10*	45,6 ± 2,4*
Доза опромінення, 0,5 Гр		
1 год	0,25 ± 0,05*	42,5 ± 2,2
12 год	0,31 ± 0,08*	44,2 ± 2,6*
24 год	0,45 ± 0,12	52,3 ± 3,0*
Доза опромінення, 1,0 Гр		
1 год	0,21 ± 0,06*	59,7 ± 3,4*
12 год	0,25 ± 0,05*	58,3 ± 3,3*
24 год	0,42 ± 0,10	49,6 ± 2,9*

* $p \leq 0,05$ відносно контролю.

нону можуть втрачати здатність каталізувати окисні перетворення в дихальному ланцюгу мітохондрій. Не виключаються й пошкодження убіхінону внаслідок його пероксидації, що спричинює втрату його функції переносника в ланцюзі транспорту електронів, оскільки він здійснює регуляторний вплив на функціонування сукцинатдегідрогенази, НАД · Н — дегідрогенази та комплексів цитохромів.

Таким чином, отримані результати свідчать про різнопланові порушення функціональної активності електронно-транспортного ланцюга мітохондрій ентероцитів при дії іонізуючої радіації низької потужності, на що вказують виявлені зміни вмісту його компонентів (цитохромів груп *b*, *c*, *a* та убіхінону) [8].

1. *Куташметов Ю. О., Войціцький В. М., Хижняк С. В.* Радиобіологія. Підручник. – Київ: ВПЦ “Київський університет”, 2011. – 543 с.
2. *Эйдус Л. Х.* Мембранный механизм биологического действия малых доз. – Москва: Изд-во Ин-та теорет. и эксперим. физики РАН, 2001. – 81 с.
3. *Burlakova E. B., Goloshchapov A. N. et al.* New aspects of regularities in the action of low doses of low-level irradiation // Low doses of radiation: are they dangerous? / Ed. E. B. Burlakova. – Huntington: Nova Sci., 2000. – P. 1–14.
4. *Азмеров Р. Н.* Выделение интактных митохондрий из слизистой кишечника // Узб. биол. журн. – 1978. – № 4. – С. 38–41.
5. *Мозгова Е. Н., Жигачева И. В.* Концентрация цитохромов в митохондриях и гомогенате при адаптации к холоду // Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. – Москва: Наука, 1977. – С. 138–146.
6. *Методы биохимических исследований* / Под. ред. М. И. Прохоровой. – Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 269 с.
7. *Покровский А. А., Мальцев Т. Ю.* Особенности переноса электронов в митохондриях слизистой желудка // Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. – Москва: Наука, 1977. – С. 175–180.
8. *Грубська Л. В., Войціцький В. М., Хижняк С. В.* Вплив іонізуючого випромінювання низької потужності на стан ланцюга переносу електронів мітохондрій ентероцитів тонкої кишки щурів // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 1. – С. 45–52.
9. *Цибулін О. С., Якименко І. Л.* Дія монохроматичного видимого світла на енергетичну систему мітохондрій // Там само. – 2006. – **78**, № 5. – С. 16–21.
10. *Донченко Г. В., Кучменко О. Б., Петухов Д. М.* Біохімічні властивості і функціональна роль убіхінону. Практичні аспекти застосування // Там само. – 2005. – **77**, № 5. – С. 24–35.
11. *Скулачев В. П.* Энергетика биологических мембран. – Москва: Наука, 1989. – 564 с.
12. *Жукова А. А., Гогвадзе В. Г.* Влияние высоких доз γ -радиации на энергетику митохондрий печени крыс // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1997. – **37**, № 3. – С. 382–386.

ННЦ “Інститут біології” Київського
національного університету ім. Тараса Шевченка
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України, Київ
Національний університет біоресурсів
і природокористування України, Київ

Надійшло до редакції 15.05.2012

Л. И. Степанова, Л. В. Грубская, С. В. Хижняк, В. М. Войцицкий

Цитохромы дыхательной цепи митохондрий энтероцитов тонкого кишечника крыс при воздействии ионизирующей радиации

Проведено исследование содержания комплексов цитохромов и убихинона во внутренней мембране митохондрий клеток слизистой оболочки тонкого кишечника крыс после однократного воздействия ионизирующего излучения низкой мощности (0,055 Гр/мин). Выявлены количественные изменения содержания цитохромов групп b, c, a и уменьшение содержания убихинона в митохондриальной мембране после воздействия ионизирующей радиации в дозах 0,1, 0,5, 1,0 Гр через 1, 12, 24 ч после облучения, что обуславливает модификацию функциональных свойств митохондрий.

L. I. Stepanova, L. V. Grubaska, S. V. Khyzhnyak, V. M. Voitsitsky

Cytochromes of the mitochondrial respiratory chain of rat's small intestine enterocytes under ionizing radiation action

The content of the cytochrome complexes and ubiquinone in mitochondrial inner membranes of mucosa cells of small intestine in rats is investigated after the single action of low-power ionizing radiation (0.055 Gy/min). The revealed quantitative changes of cytochromes of groups b, c, a and the decreased ubichinone content in the inner membrane of mitochondria after the action of ionizing radiation in doses of 0.1; 0.5 and 1.0 Gy in 1, 12 and 24 hours after irradiation can cause a modification of mitochondrial functional properties.