

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР  
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
РЕНТГЕНО-РАДИОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

---

На правах рукописи

РЫСКУЛОВА  
Сауле Тураровна

УДК 577.391:576.314:539.16.04

МЕХАНИЗМЫ РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ  
МЕМБРАН

03.00.01 - радиобиология

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
доктор биологических наук

Ленинград - 1986 г.

Работа выполнена в лаборатории радиобиологии клеток  
Института зоологии АН КазССР

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор ХАНСОН Кайдо Паулович

доктор биологических наук, профессор БУРЛАКОВА Елена Борисовна

чл.-корр. АН СССР, доктор биологических наук, профессор

КУЗИН Александр Михайлович

Ведущее учреждение – Московский государственный  
университет им. М.В.Ломоносова

Защита диссертации состоится " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 198 г.  
в \_\_\_\_\_ часов на заседании специализированного совета  
Д 074.23.01 по защите докторских диссертаций при Центральном  
научно-исследовательском рентгено-радиологическом институте  
Министерства здравоохранения СССР по адресу:

188646, г. Ленинград, п.Песочный-2, ул.Ленинградская, 70/4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Централь-  
ного научно-исследовательского рентгено-радиологического инсти-  
тута Министерства здравоохранения СССР

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 198 г.

Ученый секретарь специализированного совета  
кандидат медицинских наук

Корытова Л.И.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. На современном этапе развития радиобиологической науки одним из актуальнейших направлений является исследование эффектов ионизирующего излучения на молекулярную организацию и функционирование биологических мембран. В мембранном аппарате клетки особое место принадлежит плазматической мембране, обладающей многими уникальными свойствами, к которым относится способность предохранять клетку от неблагоприятных внешних воздействий и поддерживать ее автономность.

В радиобиологии плазматической мембране продолжительное время не придавали должного значения. Тем не менее, обнаруженные в экспериментах практически мгновенные лучевые дефекты плазматической мембраны животных клеток, предшествующие изменениям в ядре, цитоплазме и внутриклеточных мембранах (Chandra , Stefani , 1981; Sarkar e.a. , 1983), а также ранние сдвиги величины заряда клеточной поверхности (McConnell , Kench , 1977; Sato e.a. , 1977), быстрые нарушения рецепторного аппарата (Facchini e.a. , 1976; Kštelev , Kubásova , 1977), мембранной флуоресценции (Yonai e.a. , 1979; Moelbroek , Konings , 1980) позволили исследователям прийти к выводу о существенной роли наружной мембраны в интерфазной гибели клетки.

Последние обобщающие результаты о взаимозависимой морфологической и функциональной связи клеточной поверхности и ядерного аппарата (Artvinli , 1980; Sefton e.a. , 1982; Scott, 1984), ведущей роли плазматической мембраны в регуляции клеточного деления, роста, пролиферации и дифференцировке (Reutter , 1980; Ballmer , Burger , 1982; Волков, 1983) указывают на возможный вклад в репродуктивную гибель радиационного поражения данного мембранного образования. Связь репродуктивной радиационной гибели с повреждением плазматической мембраны подтверждается возможностью модифицировать выживаемость клеток путем воздействия на их поверхность непроникающими и мембраноспецифическими препаратами. В литературе последних лет уже появились высказывания, что, несмотря на большую резистентность биомембран, чем ДНК, последствия радиации, существенные для жизни клетки, связаны с плазматической и ядерной мембранами (Yau , 1981; Kštelev , 1983; Obicha e.a. , 1984).

Таким образом, на сегодня имеются убедительные данные, свидетельствующие о важной роли плазматической мембраны в радиационном поражении клетки. Тем не менее, сама мембрана, изменение

ее структурной организации и химического состава, включающего сложный набор липидов, белков, ферментных комплексов, после воздействия ионизирующим излучением на животный организм остается фактически неисследованной. Не выяснен также вклад поверхностной мембраны в определение степени радиочувствительности клеток, тканей и организмов, не изучены механизмы действия радиомодификаторов на структурно-функциональное состояние данной мембраны. Очевидно, что познание молекулярных механизмов лучевого нарушения организации и функционирования плазматической мембраны представляет несомненный интерес и может явиться фундаментом для решения важнейших задач радиобиологии.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы - изучение механизмов радиационного изменения структурной организации и функциональных свойств плазматических мембран клеток животных, облученных в летальной дозе, а также оценка данных параметров с точки зрения модификации их химическими соединениями и видовой радиочувствительности. Исследование предусматривало обобщение современных представлений о молекулярной организации, функционировании и биогенезе плазматических мембран, анализ развития мембранной гипотезы в радиобиологии и решение ряда экспериментальных задач:

- изучение механизмов постлучевой трансформации липидной фазы плазматических мембран;
- обнаружение изменений в структурном состоянии плазматических мембран под действием ионизирующего излучения;
- определение процесса липопероксидации и величины антиоксидантной активности липидов плазматической мембраны в норме и после облучения;
- исследование систем антирадикальной защиты плазматической мембраны и их изменений в пострadiационном периоде;
- изучение механизмов лучевого нарушения активности мембраносвязанных ферментов;
- сравнительное изучение плазматических мембран клеток животных с различной радиочувствительностью в норме и после общего облучения;
- исследование механизмов модификации радиационных повреждений плазматических мембран химическими агентами.

Научная новизна. Настоящая работа является первым обобщающим исследованием влияния ионизирующего излучения на структурно-функциональное состояние плазматических мембран клеток жи-

вотных. На изолированных и высокоочищенных фракциях плазматических мембран впервые получены качественные и количественные характеристики раннего постлучевого изменения фосфолипидов, холестерина и других нейтральных липидов, жирнокислотного состава общих липидов и индивидуальных фосфолипидов, величины молярного коэффициента холестерин/фосфолипиды и липид-белковых соотношений. Представлены экспериментальные доказательства присутствия в изучаемых мембранах антиоксидантных защитных систем, включающих антиокислительную активность липидов, ферменты антирадикальной защиты и восстановленный глутатион. Прослежено изменение данных показателей на ранних этапах лучевой болезни. Проанализированы механизмы радиационного изменения активности интегральных и других ферментов, связанных с плазматической мембраной. Впервые определены структурные перестройки плазматической мембраны клеток облученных животных на уровне конформации липидных и белковых компонентов. Обнаружены корреляции между постлучевым изменением состава и количества мембранных липидов, нарушением активности мембраносвязанных ферментов и зависимости этих изменений от структурного состояния мембраны. Впервые установлены отличия в составе и реакции на лучевое воздействие плазматических мембран клеток животных с различной степенью радиочувствительности. Впервые получены данные о модификации радиационных повреждений плазматической мембраны химическими агентами и рассмотрены механизмы их радиозащитного действия, опосредуемого клеточной поверхностью.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Нарушение структурного состояния плазматической мембраны клеток летально облученных животных является ведущим в механизмах радиационного поражения данного мембранного образования.

2. Комплекс пострadiационных изменений липидной и белковой фаз приводит к снижению кооперативности и текучести плазматической мембраны с переходом ее в жестко-структурированное состояние.

3. На ранних этапах лучевого поражения в плазматической мембране не происходит существенного усиления процессов свободнорадикального окисления липидов, что свидетельствует о существовании в ней компенсаторно-приспособительных механизмов.

4. Пострадиационные изменения активности ферментов плазматической мембраны в значительной мере обусловлены нарушением

ее микровязкости и состояния структурных липидов.

5. Плазматические мембраны клеток животных, различающихся степенью радиочувствительности, имеют структурно-функциональные особенности как в исходном состоянии, так и в реакции на общее облучение.

6. Химические радиопротекторы различных классов, вводимые животным до облучения, проявляют сходное неспецифическое действие на функциональное состояние плазматической мембраны и снижают ее радиопоражаемость.

Теоретическая и практическая значимость. Совокупность представленных в диссертационной работе данных можно рассматривать как новое научное направление – изучение молекулярных механизмов радиационных структурно-функциональных перестроек плазматической мембраны, их вклада в лучевое повреждение клетки, в определение параметров и путей модификации радиочувствительности. Результаты исследования способствуют созданию принципиально новых подходов к раскрытию вопросов фундаментальной радиобиологии. Они позволяют считать, что разработка направленных изменений состояния плазматической мембраны является перспективной в решении задач прикладной радиобиологии, связанных с вопросами модификации радиочувствительности, могут служить основой для выяснения процессов, происходящих в клетке при лучевой и химиотерапии злокачественных новообразований, онкогенной трансформации, действия лекарственных соединений. Подобные исследования имеют также большое значение для решения вопросов общебиологического характера.

Апообания работы и публикации. Материалы диссертации доложены на: 2 Всесоюзном симпозиуме по медицинской энзимологии (Душанбе, 1974); III и IV Всесоюзных биохимических съездах в Риге (1974) и Ленинграде (1979); 2 Всесоюзном симпозиуме "Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животных и человека" (Ленинград, 1975); 2 и 3 Конференциях биохимиков Средней Азии и Казахстана во Фрунзе (1976) и Душанбе (1981); Всесоюзном симпозиуме "Влияние радиации на регуляторные процессы в клетке" (Пушино, 1976); Всесоюзной конференции "Механизмы действия радиации на мембраны и возбудимые системы" (Тбилиси, 1976); Всесоюзном симпозиуме "Роль и механизмы действия биологически активных соединений в гамма-облученном организме" (Пушино, 1978); Всесоюзном симпозиуме "Радиочувствительность и процессы восстановления у животных и растений" (Ташкент, 1979);

IV Всесоюзном симпозиуме "Теоретические основы модификации радиочувствительности" с участием ученых зарубежных стран (Алма-Ата, 1980); Всесоюзном рабочем совещании "Является ли мембрана критической мишенью действия облучения?" (Пушино, 1981); Научно-теоретической конференции (Пермь, 1981); 2 Всесоюзной школе-семинаре по радиобиологии (Пермь, 1981); I Всесоюзном биофизическом съезде (Москва, 1982); Всесоюзном рабочем совещании "Роль эндогенных биологически активных веществ в формировании радиационных эффектов" (Пушино, 1983); Пленуме научного совета АН СССР по проблемам радиобиологии (Пушино, 1986).

По материалам диссертации опубликовано 40 работ, в числе которых монография.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 8 глав, заключения, выводов и приложения. Работа изложена на 482 страницах, включает 28 рисунков и 33 таблицы. Список использованной литературы содержит 230 источников на русском и 648 - на иностранных языках.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом служили самцы белых крыс массой 150-200 г, морских свинок (350-400 г), золотистых хомячков (80-90 г) и мыши (15-25 г). Основным объектом изучения были плазматические мембраны клеток печени, а также опухолей и эритроцитов. Кроме того, исследованы фракции ядер, микросом, митохондрий и клеточный гомогенат. Животных облучали на установке РУМ-17 при 180 кВ, 15 мА, 3,0 А1 (или 1,0 А1+ 0,5 Сu), мощности дозы 1,4 Гр/мин и кожно-фокусном расстоянии 50 см. Доза облучения составляла для крыс 7,65, морских свинок - 3,83, золотистых хомячков - 9,97 Гр. Животных забивали одномоментной декапитацией.

Фракции плазматических мембран получали методом Ray (1970) с некоторыми собственными модификациями. Мембранный материал очищали с помощью многоступенчатого градиента сахарозы на бакет-роторе ультрацентрифуги "Spinco L3-50" (Австрия) или VSC-601" (ГДР) при 105 тыс. г. Степень частоты контролировали по уровню активности ферментов-маркеров, содержанию структурных липидов, плотности изолированных мембранных фракций и электронной микроскопией. Срезы изготавливали на ультрамикротоме фирмы "ЛКВ". Снимки получали на электронном микроскопе "УЭМВ-100К" при электронно-оптическом увеличении в 16 тыс. раз.

Исследование общих и индивидуальных фосфолипидов, нейтраль-

ных липидов, жирнокислотного состава общей липидной фазы и фракций фосфолипидов, измерение содержания малондиальдегида, удельной концентрации свободного холестерина в плазматических мембранах включало проведение двумерной микротонкослойной, однонаправленной двухстадийной и газожидкостной хроматографии ("Хром-42", СССР), биохимические анализы. Антиокислительную активность липидов мембран определяли на модели термического окисления метилового эфира олеиновой кислоты. Удельную активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -АТФазы,  $\text{Mg}^{2+}$  -АТФазы,  $\text{HCO}_3^-$  -АТФазы, 5'-нуклеотидазы, глюкозо-6-фосфатазы, сукцинатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, липидзависимой и водорастворимой каталазы, щелочной глицерофосфатазы, концентрацию восстановленного глутатиона и белка измеряли соответствующими биохимическими методами. Полученные данные подвергали статистической обработке (Рокицкий, 1973). О конформационном состоянии плазматических мембран судили по спектрам мембранных препаратов, приготовленных в виде вакуумной пресс-формы и записанным на инфракрасном спектрофотометре "UR-20" фирмы "Zeiss".

Исследования проводили с 1972 по 1984 г.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### Липидная фаза плазматических мембран и механизмы ее пострadiaционной трансформации

Изучение липидного бислойа плазматических мембран клеток печени контрольных животных показало, что его состав отвечает основным закономерностям распределения различных классов липидов в данных мембранах (табл. 1). Выявлены характерные специфические признаки - значительное содержание холестерина, фосфатидилхолина, сфингомиелина и относительно высокое молярное соотношение холестерин/фосфолипиды. Данные показатели наряду с другими биохимическими параметрами, а также ультраструктурными характеристиками свидетельствуют о достаточно высокой степени чистоты изучаемых мембранных фракций. Общее облучение животных вызывало трансформацию липидного бислойа, сопровождающуюся уменьшением уровня липид-белкового соотношения до 84,9 - 59,9% от исходного, количества липидного фосфора в пределах 30,8%, свидетельствующего о снижении суммарного объема фосфолипидов (табл. 2).

Фосфолипиды. На фоне уменьшения валового количества фосфо-

Таблица 1

Липидные показатели плазматических мембран печени  
контрольных крыс (n = 4-6)

| Компонент                                              | Показатель |
|--------------------------------------------------------|------------|
| Липиды, мг/г сырой печени                              | 0,299±0,03 |
| Липид/белок, мг                                        | 0,431±0,04 |
| Общие фосфолипиды, мкг $\Phi_n$ /мг липидов            | 59,20±2,61 |
| <u>Индивидуальные фосфолипиды, % липидного фосфора</u> |            |
| Фосфатидилхолин (ФХ)                                   | 38,23±7,18 |
| Сфингомиелин (См)                                      | 30,07±3,06 |
| Фосфатидилэтаноламин (ФЭ)                              | 17,60±2,89 |
| Фосфатидилинозит (ФИ)                                  | 8,40±0,02  |
| Фосфатидилсерин (ФС)                                   | 5,70±2,09  |
| <u>Нейтральные липиды, % суммы</u>                     |            |
| Холестерин                                             | 56,26±1,95 |
| Свободные жирные кислоты                               | 17,18±1,12 |
| Эфиры жирных кислот                                    | 2,70±0,80  |
| Триглицериды                                           | 8,70±1,62  |
| 1,2-диглицериды                                        | 6,07±0,82  |
| 3,4-диглицериды                                        | 3,46±1,01  |
| Моноглицериды                                          | 5,63±1,87  |
| Холестерин/фосфолипиды, моль/моль                      | 0,60±0,02  |
| Антиокислительная активность (АОА), ч.мл/г             | 2690±310   |

Таблица 2

Показатели состояния липидной фазы плазматических  
мембран печени облученных крыс (n = 3-5)

| Время после облучения, ч | Общие фосфолипиды, мкг $\Phi_n$ /мг липидов | Холестерин, % от общих липидов | Холестерин/фосфолипиды, моль/моль | Липид/белок |
|--------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| Контроль                 | 59,20±2,61                                  | 15,68±1,46                     | 0,60                              | 0,431       |
| 15 мин                   | 46,48±5,39                                  | 16,03±3,10                     | 0,73                              | 0,350       |
| 1                        | 52,90±1,48                                  | 18,38±2,21                     | 0,80                              | 0,257       |
| 12                       | 41,00±2,01                                  | 22,10±1,40                     | 0,91                              | 0,364       |
| 24                       | 49,34±4,02                                  | 28,00±2,52                     | 1,05                              | 0,366       |

липидов содержание индивидуальных фракций данных липидов в мембране после облучения претерпевает разнонаправленные изменения. В целом отмечалось увеличение СМ, ФЭ и ФС при снижении уровня ФХ и ФИ (рис. 1-5). Самые значительные количественные перестройки претерпевает ФИ. Через 1, 12 и 24 ч после облучения его объем снижается в 4 раза и более по сравнению с контрольным. Однако выход из мембраны ФИ сопровождается одновременным возрастанием уровня другого легкоокисляемого фосфатида - ФЭ, а тенденция к снижению трудноокисляемого ФХ компенсируется увеличением количества также устойчивого к окислению СМ. Соотношение ФХ/ФЭ, в норме равное 2,17, во все периоды наблюдения после облучения падает, составляя 1,24 и 1,54 через 12 и 24 ч соответственно, а СМ/ФХ возрастает до значений более единицы при 0,79 в контроле. Таким образом, все главные и минорные фосфатиды плазматической мембраны проявляют чувствительность к облучению, но их перестройки на ранних этапах носят выраженный адаптивный характер.

Жирные кислоты. В общей липидной фракции плазматических мембран в контроле было определено и идентифицировано 19 жирных кислот с длиной цепи  $C_{12}$  -  $C_{26}$ , из которых 7 - насыщенного и 12 - ненасыщенного ряда (табл. 3). Основная доля насыщенных кислот представлена пальмитиновой (16:0) и стеариновой (18:0). Комплекс ненасыщенных кислот включает в большем объеме такие незаменимые кислоты, как арахидоновая (20:4), линолевая (18:2) и олеиновая (18:1), а также тетракозатетраеновая (24:4). Отношение суммы насыщенных кислот к ненасыщенным (коэффициент насыщенности) составило 0,86, что свидетельствует о высокой насыщенности липидного бислоя.

Как показали эксперименты с облучением, общая липидная фаза в ранние периоды (15 мин, 1 ч) теряет такие длинноцепочечные кислоты, как 24:1, 24:2, 24:4 и 22:2, в результате чего наблюдается некоторое увеличение коэффициента насыщенности. В последующем уровень данных кислот восстанавливается и рассматриваемый коэффициент приближается к исходному (см. табл. 3).

Несмотря на отсутствие значительных пострадиационных изменений в жирнокислотном составе общей липидной фазы плазматических мембран, ацильные цепи каждого индивидуального мембранного фосфатида претерпевают существенные качественные и количественные перестройки. Так, облучение вызывает значительный прирост поли- и ненасыщенных жирных кислот, а также некоторое

Изменение жирнокислотного состава плазматических мембран печени облученных крыс, % к сумме кислот (n = 4-6)

| Кислота                     | Время после облучения, ч |            |            |            |            |
|-----------------------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                             | Контроль                 | 15 мин     | I          | I2         | 24         |
| I2:0                        | 0,59±0,16                | 0,17±0,07  | 0,54±0,15  | 0,45±0,06  | 0,39±0,11  |
| I4:0                        | 0,83±0,16                | 1,24±0,48  | 0,69±0,15  | 0,47±0,15  | 0,58±0,22  |
| I5:0                        | 0,67±0,16                | 0,61±0,10  | 0,44±0,12  | 0,53±0,06  | 0,69±0,20  |
| I6:0                        | 21,46±1,63               | 24,14±1,94 | 21,78±0,58 | 18,57±1,14 | 22,72±1,44 |
| I6:1                        | 1,12±0,24                | 2,11±0,96  | 1,37±0,24  | 1,72±0,52  | 2,18±0,52  |
| I8:0                        | 19,63±1,85               | 20,06±0,92 | 21,66±0,84 | 21,22±2,63 | 21,53±1,42 |
| I8:1                        | 7,36±0,59                | 11,21±1,01 | 8,15±0,09  | 7,10±0,88  | 8,45±0,73  |
| I8:2                        | 8,05±0,66                | 9,31±0,97  | 8,82±0,38  | 7,92±1,39  | 5,86±1,35  |
| I8:3                        | 0,84±0,29                | 0,40±0,17  | 0,64±0,14  | 0,31±0,08  | 0,81±0,23  |
| 20:0                        | 0,90±0,16                | 0,69±0,27  | 0,91±0,21  | 0,10±0,01  | 0,94±0,31  |
| 20:2                        | 0,85±0,21                | 0,72±0,21  | 0,78±0,22  | 0,31±0,02  | 1,21±0,55  |
| 20:4                        | 16,42±2,19               | 16,72±0,84 | 17,34±1,22 | 20,93±1,73 | 18,73±1,74 |
| 22:1                        | 1,55±0,43                | 1,13±0,43  | 1,54±0,17  | 1,16±0,17  | 1,83±0,46  |
| 22:2                        | 2,68±0,55                | 2,60±0,36  | 0,73±0,25  | 1,29±0,20  | 3,06±0,80  |
| 24:1                        | 2,87±0,68                | 0,88±0,35  | 2,35±0,31  | 2,81±0,87  | 2,80±0,78  |
| 24:2                        | 3,62±0,53                | 0,82±0,15  | 3,23±0,50  | 2,03±0,07  | 2,76±0,76  |
| 24:4                        | 8,04±1,74                | 3,14±0,73  | 6,61±0,31  | 6,97±0,73  | 4,70±1,56  |
| 26:0                        | 2,13±0,84                | 2,43±0,86  | 1,71±0,37  | 4,51±1,77  | -          |
| 26:1                        | 0,39±0,04                | 1,63±0,66  | 0,71±0,24  | 2,00±0,05  | 0,76±0,18  |
| Насыщенные/<br>ненасыщенные | 0,86                     | 0,97       | 0,91       | 0,83       | 0,88       |

снижение уровня насыщенных кислот в ФХ, в результате чего коэффициент насыщенности жирнокислотных остатков данного фосфатида, равный в норме 2,32, уменьшается наиболее заметно через 15 мин и 12 ч (рис. 1).

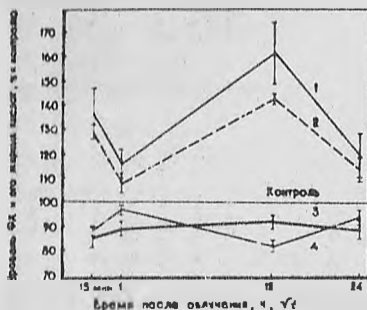


Рис. 1 Изменение содержания ФХ и его жирных кислот в плазматических мембранах (ПМ) печени облученных крыс: 1 — полиненасыщенные; 2 — ненасыщенные; 3 — ФХ; 4 — насыщенные жирные кислоты

Еще более значительно возрастает после облучения ненасыщенность углеводородных цепей другого главного фосфатида изучаемых мембран — СМ (рис. 2). Через 1 ч, в период увеличения уровня самого фосфатида, процент полиненасыщенных кислот достигает 318. Одновременно наблюдается выход пальмитиновой и стеариновой кислот, а также появление новых, несвойственных данному липиду, ненасыщенных кислот. В результате таких перестроек коэффициент насыщенности падает в исследуемые периоды с 4,29 до 1,81–1,31.

Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в ФЭ — третьем главном фосфатиде плазматических мембран — остается фактически неизменным в течение 12 ч после облучения. Уровень же полиненасыщенных кислот возрастает и достигает через 24 ч двухкратного прироста (рис. 3), за счет чего в этот период увеличивается и общая ненасыщенность жирнокислотных цепей ФЭ. Коэффициент насыщенности фосфатида в это время снижается с 2,45 до 1,60. Основным изменениям подвергается содержание линолевой и арахидоновой кислот, достигающее 200 и 350% соответственно.

Углеводородные цепи минорного легкоокисляемого ФС в течение 12 ч после облучения накапливают (до 300–470%) полиненасыщенные жирные кислоты (рис. 4), за счет чего увеличивается общая ненасыщенность его цепей. Однако спустя 24 ч после воздействия полиненасыщенные кислоты данного фосфатида полностью исчезают и ненасыщенность падает на 60%. В результате коэффициент насыщенности фосфолипида повышается с 3,6 до 13,8.

Постлучевая деградация другого минорного фосфолипида плазматических мембран (ФИ) сопровождается небольшим возрастанием

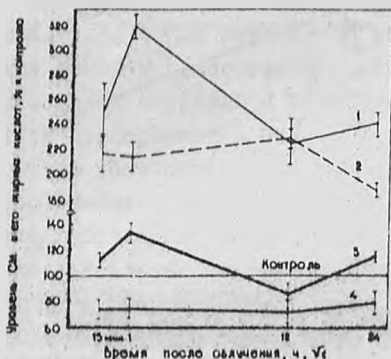


Рис. 2 Изменение содержания СМ и его жирных кислот в ПМ печени облученных крыс: 1 — полиненасыщенные; 2 — ненасыщенные; 3 — СМ; 4 — насыщенные жирные кислоты

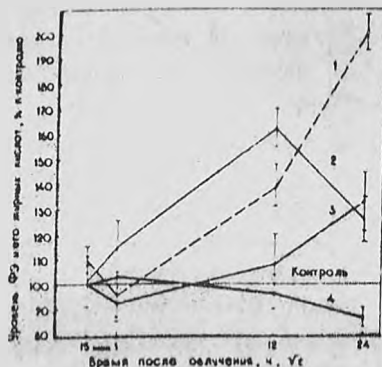


Рис. 3 Изменение содержания ФЭ и его жирных кислот в ПМ печени облученных крыс: 1 — полиненасыщенные; 2 — ненасыщенные; 3 — ФЭ; 4 — насыщенные жирные кислоты

уровня насыщенных кислот через 15 мин и 24 ч при одновременном снижении ненасыщенных (рис. 5). Параллельно прогрессивно уменьшается количество полиненасыщенных кислот и через 24 ч их остается 54%. В результате коэффициент насыщенности фосфатида возрастает с 1,85 до 2,83.

Как видно, в легкоокисляемых фосфатидах мембраны к концу первых суток после облучения происходит выраженное уплотнение углеводородных цепей. Такое явление обусловлено, с одной стороны, потерей длинноцепочечных полиненасыщенных кислот, обеспечивающих жидкость упаковки. С другой, — известным фактом, что ненасыщенные линолевая и линоленовая кислоты могут восстанавливаться под действием атакующих радикалов с количественным превращением в насыщенную стеариновую. Подобная закономерность наглядно выступает в ФС и ФМ через 24 ч после облучения.

Таким образом, изменение окисляемости ацильных цепей индивидуальных фосфолипидов плазматических мембран после облучения носит двунаправленный характер. Жирнокислотный состав главных фосфатидов претерпевает перестройки с увеличением доли ненасыщенных кислот. Противоположная закономерность прослеживается в жирнокислотном составе легкоокисляемых минорных фосфатидов. Происходит как бы обменная компенсация, результатом которой с

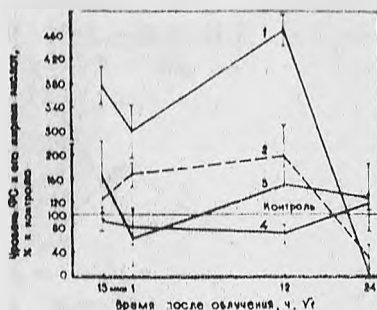


Рис. 4 Изменение содержания ФС и его жирных кислот в ПМ печени облученных крыс: 1 - полиненасыщенные; 2 - ненасыщенные; 3 - ФС, 4 - насыщенные жирные кислоты

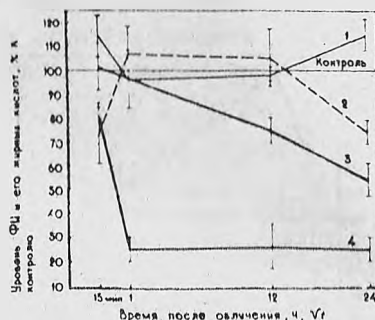


Рис. 5 Изменение содержания ФМ и его жирных кислот в ПМ печени облученных крыс: 1 - насыщенные; 2 - ненасыщенные; 3 - полиненасыщенные жирные кислоты; 4 - ФМ

учетом вклада свободных жирных кислот и их эфиров, а также антиокислительной активности липидов, систем антирадикальной защиты и мембранного холестерина является поддержание ненасыщенности всей липидной фазы плазматических мембран на уровне, близком к контрольному. Такие перестройки липидного бислоя могут свидетельствовать об определенной способности наружной мембраны клетки к репарации.

**Нейтральные липиды.** Основная масса нейтральных липидов изучаемых мембран представлена свободным холестерином, отношение которого к сумме остальных фракций липидов данного класса составляет в контроле 1,29. В мембранах облученных животных уровень холестерина возрастает, и указанное отношение соответственно увеличивается, становясь равным 2,31 уже через 15 мин. Приросту холестерина сопутствует снижение количества суммарных ди- и триглицеридов в течение 12 ч после воздействия. Спустя 15 мин и 1 ч заметно возрастает содержание эфиров жирных кислот, однако через 24 ч оно уменьшается до значений ниже исходных. На протяжении всего периода исследования снижалась концентрация моноглицеридов, но масса триглицеридов оставалась стабильной. Количество свободных жирных кислот уменьшалось лишь через 15 мин после облучения, когда уровень холестерина был наиболее высок. В дальнейшем колебание показателей свободных жирных кислот находились в пределах контрольных величин. Отсутствие увеличения в плазматических мембранах данных кислот является положительным признаком, так как их возрастание обычно усугубляет разви-

тие патологического процесса.

Из данных таблицы 2 следует, что именно в ранние периоды после облучения отмечается наибольшее обогащение плазматических мембран холестерином, хотя повышенный уровень стерина в мембранах сохранялся в течение 60 сут после облучения. Результаты экспериментов показали, что одновременно с возрастанием объема холестерина снижается суммарное количество структурных фосфолипидов, на основании чего молярное соотношение холестерина/фосфолипиды увеличивается во все интервалы времени, достигая наибольшей величины через 24 ч после облучения. Повышение данного соотношения, а также  $СМ/ФХ$  в совокупности с падением липид-белкового показателя, деградацией  $ФИ$  и снижением величины  $АОА$  липидов свидетельствует об увеличении вязкости плазматической мембраны под действием ионизирующего излучения.

#### Радиационные нарушения структурного состояния плазматических мембран

С помощью инфракрасной спектроскопии (ИКС) рассмотрены конформационные изменения плазматических мембран клеток печени крыс в контроле и через 1, 24, 72 ч и 7 сут после общего рентгеновского облучения животных. Показано, что мембраны клеток печени контрольных крыс имеют характеристичные для белок-липидного комплекса полосы поглощения в ИК-области: амид А ( $3300\text{ см}^{-1}$ ), амид I ( $1655\text{ см}^{-1}$ ), амид II ( $1545\text{ см}^{-1}$ ), амид III ( $1240\text{ см}^{-1}$ ), отношение оптической плотности которых оказалось строго постоянным: 3:3:2:1 (рис. 6). Через 1 ч после облучения изменялась

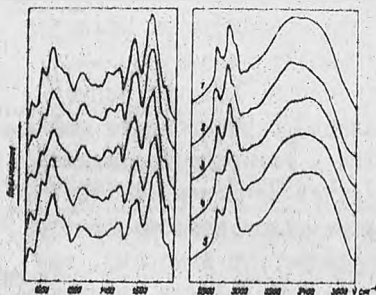


Рис. 6 ИК-спектры ПМ печени крыс в контроле (1) и через 1, 24, 72 ч, 7 сут после облучения (2-5)

ориентация полипептидных цепей и становилась более свободной их упаковка. Увеличивалась относительная интенсивность валентных колебаний  $CO$ -связей в пептидных группах белка ( $1655\text{ см}^{-1}$ ), валентных колебаний  $OH$ -связей ( $3300\text{ см}^{-1}$ ), а также деформационных колебаний связей  $NH$  и  $CH$  ( $1545\text{ см}^{-1}$ ). Соотношение оптичес-

них плотностей амидных полос в этот срок составило 4:5:2,5:1, а через 7 сут после облучения оно приблизилось к контрольному. Более четко выраженное плечо при 1650-1540  $\text{см}^{-1}$  свидетельствует об увеличении вклада в спектр  $\beta$ -формы белка.

Степень подвижности углеводородных цепей жирных кислот может характеризоваться отношением интенсивности поглощения при 2885 и 2850  $\text{см}^{-1}$ . В изучаемых мембранах контрольных животных полоса 2850  $\text{см}^{-1}$ , связанная с вращательным движением карбогидрата, оказалась узкой и интенсивной, что характерно для рыхлой кристаллической структуры и связано с уменьшением межмолекулярных взаимодействий. Во все сроки после облучения постепенно уширялись полосы 2850  $\text{см}^{-1}$  и снижалось поглощение при 2885  $\text{см}^{-1}$ . Отношение поглощения 2885/2850 претерпевало изменения, свидетельствующие о разупорядочивании укладки ацильных цепей, снижении их подвижности и усилении гидрофобных взаимодействий. Такое состояние сопровождалось затруднением вращательных и преобладанием колебательных движений в СН-связях. Одновременно с отмеченными явлениями обнаруживался низкочастотный сдвиг интенсивности поглощения - признак усиления водородных связей, что подтверждает их высокую радиочувствительность. Не исключено, что зафиксированное усиление водородных связей может быть следствием увеличения концентрации холестерина в плазматической мембране после облучения, что и было нами обнаружено биохимически.

Для асимметричных валентных колебаний  $\text{CH}_2$  отмечены уширение и уменьшение интенсивности полосы 2920  $\text{см}^{-1}$ , особенно через 72 ч и 7 сут после облучения. В эти же сроки обнаружены различия в области 1400-1450  $\text{см}^{-1}$ , которые указывают на значительные нарушения в ориентации жирнокислотных цепей. Количественное соотношение липид-белок также изменялось, о чем говорит поглощение в области 1740  $\text{см}^{-1}$ , относящееся к головкам фосфолипидов. Вместе с этим полоса 2960  $\text{см}^{-1}$ , в отличие от плеча 2885  $\text{см}^{-1}$ , сохранялась. Судя по форме и полуширине полос поглощения при 3320  $\text{см}^{-1}$  происходит увеличение гидрофильности мембраны, заметно влияющей на характер липидного микроокружения интегральных белков (Ивков, Берестовский, 1982).

Таким образом, в ИК-спектрах плазматических мембран клеток печени крысы уже через 1 ч после облучения отмечены существенные изменения, касающиеся белковой и липидной компонент мембраны, включая головки фосфолипидов и жирнокислотные остатки.

Дестабилизация белковой компоненты (1, 24 ч) постепенно сменялась жесткой структурированностью, что, по-видимому, было обусловлено накоплением холестерина в мембране и увеличением силы межмолекулярных взаимодействий в липидном бислое. Представленные спектроскопические данные коррелируют с биохимическими показателями и раскрывают тонкие механизмы радиационного поражения структуры плазматических мембран.

Липопероксидация, антиокислительная активность и системы антирадикальной защиты плазматических мембран в норме и при облучении

Переокисление мембранных липидов. На основании постлучевого развития жесткой структурированности плазматической мембраны после облучения можно было ожидать снижения доступности полиненасыщенных ацилов и соответственно скорости аутоокисления мембранных липидов. Действительно, концентрация МДА в свежeweделенных препаратах плазматических мембран не только не увеличивается, но и снижается втрое через 72 ч и 7 сут после облучения (табл. 4). При инкубации мембранных препаратов в среде, не содержащей индукторов свободнорадикального окисления, падает

Таблица 4

Показатели свободнорадикального окисления липидов плазматических мембран печени контрольных и облученных крыс, нмоль МДА/мг белка

| Показатель                   | Контроль  | Время после облучения  |                        |                        |
|------------------------------|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                              |           | 1 ч                    | 72 ч                   | 7 сут                  |
| Количество МДА               | 0,28±0,04 | 0,34±0,01              | 0,09±0,01 <sup>X</sup> | 0,09±0,01 <sup>X</sup> |
| Аутоокисление                | 0,37±0,03 | 0,21±0,05 <sup>2</sup> | 0,05±0,01 <sup>X</sup> | 0,03±0,01 <sup>X</sup> |
| Аскорбат-зависимое окисление | 1,27±0,18 | 1,96±0,50              | 3,90±0,25 <sup>X</sup> | 1,37±0,18              |
| НАДФ-Н-зависимое окисление   | 3,45±0,40 | 3,50±0,80              | 5,28±0,31 <sup>X</sup> | 3,11±0,27              |

<sup>X</sup> Отличия от контрольных значений достоверны.

также скорость аутоокисления липидов. Ферментативная и неферментативная индукция перекисного окисления липидов (ПОЛ) остается неизменной через 1ч и 7 сут после воздействия.

Таким образом, результаты экспериментов свидетельствуют, что липиды плазматических мембран животных клеток хорошо защищены от индуцированного радиацией переокисления. Адаптивное сниже-

ние текучести бислоя, по-видимому, препятствует возрастанию уровня перекисей и приводит к торможению других мембранных процессов при лучевой патологии. Кроме того, состояние ПОЛ в мембране после облучения может быть связано с присутствием в ней собственных антиоксидантов и редокс-систем.

Антиокислительная активность липидов. Антиокислительная активность липидов, как известно, обуславливается в основном комплексом биоантиоксидантов, связанных преимущественно с жирнокислотными компонентами мембранных фосфолипидов и выполняющих собственную структурную роль (Бурлакова и др., 1975). В литературе нет сведений об АОА липидов плазматических мембран животной клетки в норме и при облучении. Нашими экспериментами в плазматических мембранах клеток печени крысы установлено наличие АОА липидов, равной в норме 2690±310 ч.мл/г. В мембранах облученных животных величина АОА оказалась сниженной во все периоды наблюдения (рис. 7). Через 15 мин и 1 ч она составляла

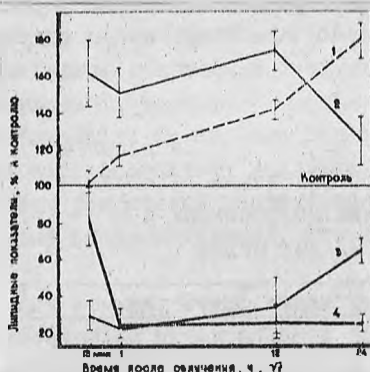


Рис. 7 Липидные показатели ПМ печени облученных крыс: 1 - холестерин; 2 - полиненасыщенные жирные кислоты суммарных фосфолипидов; 3 - АОА; 4 - ФЛ

соответственно 29,4 и 22,7%. Однако в последующие сроки замечалась тенденция к нормализации АОА, а через 24 ч после облучения она поднялась до 60,5% от контроля. Отмечалась прямая корреляция между снижением величины АОА, липид-белковых соотношений, выходом легкоокисляемого ФЛ. Уменьшение уровня АОА сопровождалось также обогащением бислоя трудноокисляемыми липидами (холестерином и СМ), а относительное повышение активности сочеталось с тенденцией к нормализации количества полиненасыщенных жирных кислот суммарных фосфолипидов. Все эти закономерности могут свидетельствовать о существенной роли мембранной АОА в постлучевых перестройках липидной фазы.

Системы антирадикальной защиты. В настоящее время значительное место в биологической защите клетки от негативных последствий переокисления наряду с биоантиоксидантами отводится специализированным ферментным системам и восстановленному глутатиону, осуществляющим антирадикальную функцию. В связи с полным отсутствием сведений о состоянии антиоксидантных систем в плазматических мембранах клеток облученного организма, нами проведены соответствующие эксперименты. Установлено, что в мембранах клеток печени присутствуют ферменты антирадикальной защиты, включающие супероксиддисмутазу (СОД), глутатионпероксидазу (ГП), глутатионредуктазу (ГР), структурносвязанную или липидзависимую (ЛК) и водорастворимую каталазу (ВК), а также восстановленный глутатион.

У облученных животных активность мембранной СОД ( $1,39 \pm 0,16$  ЕД/мг белка в контроле) значительно (на 48%) снижалась через 1 ч после облучения, затем возвращалась к исходному уровню и вновь уменьшалась, составляя через 7 сут 76% (рис. 8). В гомо-

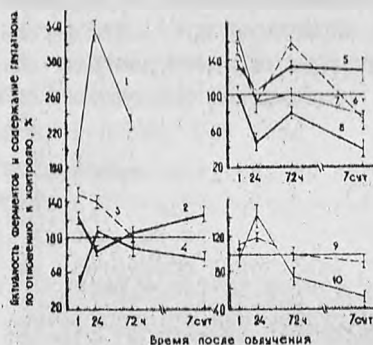


Рис. 8 Изменение активности СОД, ЛК, ВК, ГП, ГР и содержания Г'SH в ПМ и гомогенате печени облученных крыс: 1 - ЛК ПМ; 2 - СОД гомогената; 3 - ВК ПМ; 4 - СОД ПМ; 5 - ГР гомогената; 6 - ГП гомогената; 7 - ГР ПМ; 8 - ГП ПМ; 9 - Г'SH гомогената; 10 - Г'SH ПМ

генате наблюдалась прямо противоположная закономерность. В отличие от СОД, активность обеих форм каталазы после облучения резко возрастала. Индуцирование активности структурносвязанной каталазы достигало почти 340% от контроля, равного  $511,4 \pm 43,2$  мкмоль  $H_2O_2$ /мг белка. Ингибитором СОД скорее всего являлась перекись водорода, содержание которой способно возрасти в печени детально облученных животных в результате активации ксантиноксидазы и пострadiaционного радиолитиза воды (Тиунов, Кустов, 1980). Действительно, в наших опытах в период наивысшего подъема активности каталазы СОД-активность возвращалась к исходному уровню, что указывает на сопряженность работы данных ферментов

в плазматической мембране.

Облучение ингибировало активность мембранной ГП в пределах 20-62%, которая в контроле составляла  $1,21 \pm 0,11$  мкмоль ГСН/мг белка. В гомогенате же ее возрастание длилось 72 ч, однако к концу наблюдения, как и в мембранах, активность фермента падала. Субстратом ГП является восстановленный глутатион, и его регенерация из окисленной формы происходит при участии ГР. Активность ГР изучаемых мембран (исходная  $0,23 \pm 0,03$  мкмоль НАДФ-Н/мг белка) через 1 ч после облучения возрастала до 165%. В этот же период уровень глутатиона был равен контрольному ( $3,99 \pm 0,36$  мкмоль). Через 24 ч, вслед за увеличением активности ГР, на 44% повышалась масса ГСН, а спустя 7 сут на фоне снижения активности ГР падала и концентрация мембранного глутатиона. Это уровень в гомогенате в этот период оставался неизменным.

Таким образом, наиболее выраженные нарушения антиоксидантных систем в плазматических мембранах происходили в ранние периоды после облучения, когда падение СOD-активности сопровождалось индукцией каталазы, а возрастание активности ГР приводило к увеличению содержания ГСН. Отсюда следует, что важным звеном в механизмах постлучевой репарации может явиться способность плазматической мембраны защищать клетку от свободных радикалов.

#### Механизмы пострадикационного изменения активности ферментов плазматических мембран

Аденозинтрифосфатазы. Убаинчувствительная  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  -АТФаза - один из главных транспортных ферментов клетки - располагается в плазматической мембране и выступает как ее специфический интегральный белок. От работы натриевого насоса, ферментным эквивалентом которого является данная АТФаза, зависит не только транспорт ионов натрия, калия, аминокислот, углеводов и других органических соединений, но и инициация синтеза ДНК. Следовательно, натриевый насос включается в общую систему точной регуляции (Кстык, Яначек, 1980).

Учитывая важную для клетки регуляторную роль транспортных ферментов плазматических мембран, мы исследовали их удельную активность после общего рентгеновского облучения животных (табл. 5). Выявлено, что активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  -АТФазы в изучаемых мембранах клеток печени после воздействия резко снижалась и уже через 1 и 24 ч ее содержалось лишь 13,3 и 9,0% соответ-

Таблица 5

Активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - и  $\text{Mg}^{2+}$  -АТФаза плазматических мембран печени облученных крыс,  $\mu\text{моль } \Phi_{\text{H}}$  (мг белка.ч);  $n = 15$

| Время после облучения, сут | АТФаза                    |                  | Время после облучения, сут | АТФаза                    |                  |
|----------------------------|---------------------------|------------------|----------------------------|---------------------------|------------------|
|                            | $\text{Na}^+, \text{K}^+$ | $\text{Mg}^{2+}$ |                            | $\text{Na}^+, \text{K}^+$ | $\text{Mg}^{2+}$ |
| Контроль                   | 9,9±0,75                  | 49,8±1,5         | Контроль                   | 9,9±0,75                  | 49,8±1,05        |
| 1 ч                        | 1,3±0,40                  | 37,1±0,5         | 9                          | 1,4±0,23                  | 52,3±4,6         |
| 1                          | 0,9±0,09                  | 44,5±1,5         | 15                         | 1,4±0,42                  | 50,1±2,8         |
| 3                          | 2,0±0,18                  | 50,4±2,4         | 30                         | 0                         | 49,9±1,8         |
| 6                          | 1,8±0,09                  | 51,9±3,1         | 60                         | 0                         | 48,7±2,1         |

ственно, а спустя 30 и 60 сут отмечалась полная блокада натриевого насоса. В противоположность этому, неспецифическая  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, не являющаяся ионным насосом, в течение всего постлучевого периода оставалась практически без изменений.

Измерение активности вышеуказанных ферментов в ядерной, митохондриальной, надосадочной фракциях и гомогенате печени крыс после облучения также показало повсеместное угнетение работы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  -АТФазы и фактическое отсутствие изменения  $\text{Mg}^{2+}$  -АТФазной активности. При этом из всех изучаемых фракций наиболее чувствительной по  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  -АТФазе оказалась надосадочная, содержащая преимущественно плазматические мембраны. Следовательно, широко описанные в литературе ранние и значительные нарушения клеточного гомеостаза по калию, натрию, другим ионам и органическим соединениям могут быть объяснены с позиций существенного торможения деятельности натриевого насоса.

В исследуемых мембранах, как и в мембранах других клеток, нами была выявлена активность  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы, осуществляющей гидролиз АТФ и проявляющей наиболее высокую гидролитическую способность в присутствии ионов бикарбоната. Полагают, что данная АТФаза участвует в транспорте анионов (Sachs e.a., 1972). Обнаружено, что удельная активность  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы, измеренная в плазматических мембранах, гомогенате и различных субклеточных фракциях печени облученных крыс, уменьшается во все периоды наблюдения (табл. 6). Наибольшее торможение активности фермента отмечается через 1 ч после воздействия. Пострадиационное ингибирование активности фермента может свидетельствовать о раннем нарушении клеточного баланса анионов и в первую очередь

Таблица 6

Активность  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы плазматических мембран и фракций печени облученных крыс, мкмоль  $\Phi_H$ (мг белка.ч); n = 6

| Время после облучения, ч | Гомогенат | Фракция  |                  |              | Плазматические мембраны |
|--------------------------|-----------|----------|------------------|--------------|-------------------------|
|                          |           | ядерная  | митохондриальная | надосадочная |                         |
| Контроль                 | 4,9±0,8   | 10,1±1,4 | 8,1±1,1          | 0,6±0,3      | 19,7±4,1                |
| 1                        | 2,2±0,3   | 7,4±0,9  | 4,8±0,8          | 0,2±0,1      | 6,7±0,6                 |
| 24                       | 3,1±0,4   | 8,1±0,8  | 6,1±0,5          | 0,3±0,2      | 7,3±0,4                 |
| 72                       | 3,1±0,3   | 7,6±0,8  | 6,1±0,3          | 0,3±0,2      | 8,3±2,7                 |

бикарбоната. Изменение же концентрации ионов  $\text{HCO}_3^-$  создает предпосылки для сдвигов в клетке кислотно-щелочного равновесия, наступающих в тканях облученного организма.

5'-нуклеотидаза. Пострадиационное нарушение функционирования 5'-нуклеотидазы - эктоэнзима, специфичного для плазматических мембран большинства клеток млекопитающих, заключается в индуцировании ее активности в течение длительного периода (60 сут). Наибольший прирост активности фермента отмечался в ближайшие сроки после воздействия: уже через 30 мин она достигала 26,8 мкмоль  $\Phi_H$ (мг белка.ч) при норме 10,2, а спустя 1, 24 и 48 ч - 27,9, 63,7 и 46,5 мкмоль  $\Phi_H$ (мг белка.ч) соответственно.

Установлено, что практически все мембраносвязанные ферменты липидзависимы. Сопоставление наших данных об изменении липидной фазы плазматических мембран при облучении и нарушении активности встроенных в мембрану ферментов отчетливо демонстрирует их коррелятивность. Так, пострадиационное торможение работы натриевого насоса в изучаемых мембранах сочетается со снижением липид-белковых соотношений, значительной потерей ФМ, накоплением холестерина и СМ, увеличением отношений СМ/ФХ и холестерин/фосфолипиды, т.е. известным набором конкретных изменений липидных показателей, формирующих ингибирование активности мембранной  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Подобные закономерности приложимы и для обоснования постлучевого торможения активности  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы и аденилатциклазы, а также возрастания - 5'-нуклеотидазы.

Изменение активности мембраносвязанных ферментов может быть связано с радиационным уменьшением количества тиогрупп

в их активном центре. Даже частичное окисление SH-групп в условиях облучения подавляет активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, аденилатциклазы и ряда других ферментов плазматических мембран (Sku-tari o.a., 1982).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о существенном постлучевом изменении активности важнейших ферментов, встроенных в плазматическую мембрану. Основную роль в механизмах этих нарушений выполняют качественные и количественные перестройки мембранных структурных липидов.

#### Мембранные показатели в аспекте видовой радиочувствительности

Видовая и индивидуальная чувствительность млекопитающих к действию ионизирующего излучения является одной из центральных проблем в радиобиологии. Несмотря на то, что эти вопросы разрабатываются уже несколько десятилетий, решение их на мембранном уровне все еще не привлекло должного внимания экспериментаторов.

Нами получены сравнительные характеристики плазматических мембран клеток печени морских свинок, крыс и золотистых хомячков, отличающихся степенью радиочувствительности, в норме и после общего рентгеновского облучения в дозах, эквивалентных ДД<sub>50/30</sub>. Различия между мембранами исследуемых животных наблюдались уже в процессе получения и очистки препаратов. Фракция мембран морских свинок имела меньший удельный вес, а также концентрацию холестерина (39 мкг/мг белка) по сравнению с мембранами крыс (51 мкг/мг белка), что и могло определять разницу в величине плотности мембран. Проведенное нами сравнительное ИК-спектроскопическое исследование конформации плазматических мембран также выявило менее стабильную и более рыхлую упаковку липопротеинового слоя мембраны морской свинки по сравнению с мембраной крысы. У исследуемых животных оказались неоднотипными исходные показатели и ферментативной активности мембран (табл. 7). В мембранах морских свинок активность всех изучаемых ферментов была значительно ниже, чем у крыс и золотистых хомячков. Особенно это касалось интегральных ферментов —  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и 5'-нуклеотидазы. На основании полученных данных можно полагать, что плазматические мембраны более радиорезистентных золотистых хомячков по сравнению с радиочувствительными морскими свинками обладают большей функциональной активностью.

Таблица 7

Активность ферментов плазматических мембран печени  
облученных морских свинок и золотистых хомячков,  
мкмоль  $\Phi_H$  (мг белка.ч); n = 10

| Время после<br>облучения,<br>ч | $Na^+, K^+$ -<br>АТФаза | $HCO_3^-$ -<br>АТФаза  | $Mg^{2+}$ -<br>АТФаза  | 5'-нуклео-<br>тидаза   |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Морские свинки                 |                         |                        |                        |                        |
| Контроль                       | 1,55±0,42               | 9,44±3,72              | 14,4±3,89              | 0,37±0,06              |
| I                              | 2,05±0,38               | 37,6±3,35 <sup>x</sup> | 0,83±0,34 <sup>x</sup> | 0,22±0,01 <sup>x</sup> |
| 24                             | 0,68±0,25 <sup>x</sup>  | 36,2±5,98 <sup>x</sup> | 1,95±0,69 <sup>x</sup> | 0,25±0,03 <sup>x</sup> |
| 72                             | 0,56±0,15 <sup>x</sup>  | 15,4±1,57 <sup>x</sup> | 2,85±0,61 <sup>x</sup> | 0,26±0,02 <sup>x</sup> |
| Золотистые хомячки             |                         |                        |                        |                        |
| Контроль                       | 12,3±3,67               | 26,3±5,36              | 29,6±5,22              | 9,95±1,26              |
| I                              | 16,9±3,24               | 39,7±7,84 <sup>x</sup> | 30,8±10,3              | 8,56±0,97              |
| 24                             | 31,8±2,91 <sup>x</sup>  | 60,5±6,32 <sup>x</sup> | 28,0±1,56              | 9,94±1,31              |
| 72                             | 18,2±6,90               | 42,0±1,88 <sup>x</sup> | 34,9±4,95              | 8,75±0,86              |

<sup>x</sup> Различия достоверны по отношению к контролю.

Лучевое воздействие вызвало неоднотипную реакцию плазматических мембран изучаемых видов животных. В мембранах облученных крыс происходило накопление холестерина, а в мембранах морских свинок и золотистых хомячков его уровень снижался в течение всего периода (I-72 ч после облучения), однако характер такого падения имел существенные отличия. Обеднение мембран морских свинок холестерином было истощающим, и через 72 ч его оставалось лишь 17,1%. В этот период и гомогенат клеток печени данных животных терял 50% холестерина. В то же время мембраны золотистых хомячков сохраняли 60%, а гомогенат содержал 135% данного липида. Уровень фосфолипидов в мембранах и гомогенатах печени всех облученных животных имел тенденцию к снижению, наиболее выраженную у морских свинок. Через 72 ч в их мембранах фосфатидов было 57% против 78% у золотистых хомячков.

У облученных животных по-разному изменялась и активность мембраносвязанных ферментов (см. табл. 7). В мембранах золотистых хомячков, в противоположность крысам и морским свинкам,  $Na^+, K^+$ -АТФаза не только не утрачивала своей активности, а повышалась до 268,5%. Существенным для них было также отсут-

вие каких-либо изменений в активности  $5'$ -нуклеотидазы. Характерной особенностью мембран морских свинок являлось угнетение активности  $Mg^{2+}$ -зависимой АТФазы во все периоды после облучения.

Сопоставляя полученные данные, отметим наличие корреляции между снижением концентрации холестерина (увеличение текучести липидного бислоя) и возрастанием активности натриевого насоса в плазматических мембранах облученных золотистых хомячков (рис. 9). Данные явления могут характеризовать повышенную адап-

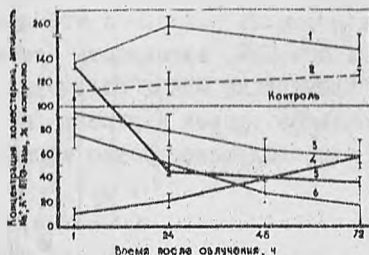


Рис. 9 Изменение активности  $Na^+, K^+$ -АТФазы и уровня холестерина в ПМ печени облученных золотистых хомячков (ЗХ), крыс (К) и морских свинок (МС): 1 -  $Na^+, K^+$ -АТФаза ЗХ; 2 - холестерин К; 3 - холестерин ЗХ; 4 -  $Na^+, K^+$ -АТФаза К; 5 -  $Na^+, K^+$ -АТФаза МС; 6 - холестерин МС

тивную реакцию гепатоцитов золотистых хомячков на облучение. У менее радиостойчивых крыс лучевая трансформация наружной клеточной мембраны свидетельствует о снижении метаболических процессов. Морские свинки, как животные, обладающие относительно высокой радиочувствительностью, проявляют картину прогрессирующего падения жизнедеятельности плазматической мембраны, что сопровождается глубоким торможением активного транспорта, истощением мембраны по холестерину и падением уровня фосфолипидов.

Таким образом, нами получены результаты, характеризующие неоднотипность исходных показателей и механизмов радиационного поражения наружных мембран клеток животных, обладающих различной радиочувствительностью.

#### Механизмы модификации радиационных повреждений плазматических мембран химическими агентами

Информации об участии плазматических мембран в механизмах действия химических модификаторов лучевого поражения крайне недостаточно. В связи с этим в нашей работе исследовано действие ряда протекторов на ферментативные показатели плазматических мембран печени крыс, а также эффекты предлучевого введения данных соединений.

Цистеамин (МЭА). Гидрохлорид МЭА, введенный внутривентриально в дозе 150 мг/кг, оказывал ингибирующее действие на активность

всех изучаемых ферментов плазматических мембран (табл. 8). Снижение под действием МЭА активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - и  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы в исследуемых мембранах сравнимо с эффектом радиации (см. табл. 5 и 6). В опытах *in vitro* внесение в среду инкубации  $2 \cdot 10^{-3}$  -  $2 \cdot 10^{-1}$  моль препарата вызывало полную инактивацию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, а  $2 \cdot 10^{-1}$  моль -  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы. Результаты экспериментов с предлучевым (за 15 мин) введением МЭА также демонстрируют кратковременное блокирование натриевого насоса через 15 мин после облучения. Однако в последующие периоды деятельность насоса усиливалась и через 72 ч полностью нормализовалась. В это время в мембранах животных, облученных без МЭА, активность насоса составляла лишь 20,2%. Совместное применение МЭА и облучения поддерживало  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазную активность на уровне контроля во все периоды наблюдения, тогда как одно облучение резко ингибировало данную активность.

Между эффектами МЭА и облучения на активность ферментов, не связанных с мембранотранспортными процессами, сходства не обнаружено. В противоположность облучению МЭА значительно тормозил активность 5'-нуклеотидазы и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран (см. табл. 8). Однако совместное применение протектора и облучения нормализовало активность и данных ферментов через 72 ч. В мембранах же облученных животных активность 5'-нуклеотидазы в этот период была увеличена более чем в 4 раза.

Как видно из представленного материала, МЭА оказывает существенное влияние на функциональные свойства наружной клеточной мембраны. Предлучевое применение данного протектора модифицирует активность мембраносвязанных ферментов, снижая тем самым чувствительность мембраны к радиации. Следовательно, плазматическую мембрану можно считать одним из важных звеньев в механизмах биологических эффектов данного серусодержащего соединения.

Катехоламины. Действие радиомодификаторов, как и самого облучения, на животный организм - весьма сложный и многофакторный процесс, в котором существенную роль играет их влияние на гормональный статус. С этих позиций, а также учитывая, что ряд гормонов, в том числе катехоламины, сами проявляют свойства радиомодификаторов, мы проследили реакцию плазматических мембран клеток печени контрольных и облученных крыс на экзогенный адреналин (гидрохлорид) в дозах (0,3 и 1,0 мг/кг), соответствующих радиозащитным.

Таблица 8

Влияние предлучевого введения МЭА на активность ферментов плазматических мембран печени крс, мкмоль  $\Phi_H$  (мг белка.ч);  $n = 5$

| Вариант опыта                       | АТФазы                                         |                                                  | $\text{HCO}_3^-$                    | 5'-нуклеотидаза                                  |
|-------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                     | $\text{Na}^+, \text{K}^+$                      | $\text{Mg}^{2+}$                                 |                                     |                                                  |
| Контрольные животные:<br>интактные  | 9,92±0,7<br>25,02±3,5                          | 49,80±1,5<br>95,27±7,7                           | 26,52±2,3<br>45,41±8,5              | 10,32±0,8<br>24,79±1,2                           |
| Через 15 мин после:<br>введения МЭА | 5,06±0,3 <sup>x</sup><br>0                     | 9,22±1,3 <sup>x</sup><br>10,71±1,2 <sup>x</sup>  | 27,89±2,8<br>33,40±3,5              | 8,25±0,2 <sup>x</sup><br>4,19±0,2 <sup>x</sup>   |
| Через 1 ч после:<br>введения МЭА    | 8,46±1,7 <sup>x</sup><br>5,17±2,0 <sup>x</sup> | 42,48±4,6 <sup>x</sup><br>5,56±0,4 <sup>x</sup>  | 13,81±1,3 <sup>x</sup><br>60,50±8,1 | 5,86±0,6 <sup>x</sup><br>5,85±0,1 <sup>x</sup>   |
| Через 12 ч после:<br>введения МЭА   | 2,02±0,2 <sup>x</sup><br>7,62±1,1 <sup>x</sup> | 53,58±5,2 <sup>x</sup><br>7,02±1,4 <sup>x</sup>  | 5,53±0,6 <sup>x</sup><br>65,17±6,9  | 4,73±0,1 <sup>x</sup><br>6,26±0,9 <sup>x</sup>   |
| Через 24 ч после:<br>введения МЭА   | 1,76±0,4 <sup>x</sup><br>14,08±2,8             | 58,90±3,2 <sup>x</sup><br>56,76±2,4 <sup>x</sup> | 1,85±0,9 <sup>x</sup><br>48,50±3,9  | 10,18±1,6 <sup>x</sup><br>14,51±0,6 <sup>x</sup> |
| Через 72 ч после:<br>введения МЭА   | 2,85±0,9 <sup>x</sup><br>20,88±0,8             | 30,00±1,4 <sup>x</sup><br>85,28±7,6              | 4,96±2,5 <sup>x</sup><br>47,46±7,0  | 4,86±0,5 <sup>x</sup><br>21,37±2,7               |

<sup>x</sup> Достоверно от контроля с физраствором.

Адреналин *in vivo*, подобно облучению, ингибировал активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы плазматических мембран (табл. 9). Инкубирование мембран с гормоном в концентрации  $5,45 \cdot 10^{-5}$ – $5,45 \cdot 10^{-4}$  моль также уменьшало активность фермента. Предлучевое (за 20 мин) введение адреналина в дозе 1 мг/кг нормализовало активность натриевого насоса через 48 ч.  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза оказалась малочувствительной к гормону. Ее активность при всех вариантах не изменялась или имела тенденцию к возрастанию. Адреналин в обеих дозах индуцировал активность  $5'$ -нуклеотидазы изучаемых мембран, т.е. в данном случае действие гормона *in vivo* оказывало эффект, сходный с радиацией. Предлучевое введение адреналина в дозе 1,0 мг/кг кратковременно нормализовало активность фермента через 1 ч после облучения, при дозе же 0,3 мг/кг подобный эффект наблюдался спустя 48 ч. Влияние гормона на активность  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы выражалось в ее значительно индуцировании, что было прямо противоположно действию радиации. Предлучевая инъекция адреналина в меньшей дозе нормализовала активность через 1 ч, в большей – через 24 и 48 ч. В остальные периоды активность фермента в мембранах была повышенной. Прямое действие гормона выражалось в подавлении активности  $\text{HCO}_3^-$ -АТФазы, особенно при дозе  $5,45 \cdot 10^{-4}$  моль.

Важным моментом в механизмах действия адреналина на функционирование плазматических мембран в норме и при действии радиации может явиться его липидмобилизующая активность и антиоксидантная роль. В этом плане обнаруженное нами на облученных животных увеличение концентрации холестерина и другие нарушения липидной фазы плазматических мембран могут быть инициированы постлучевой мобилизацией катехоламинов. Предохраняя структуру наружной клеточной мембраны от существенных перестроек, катехоламины в радиозащитных дозах таким образом предотвращают усиление процессов перекисления мембранных липидов. Следовательно, компоненты плазматических мембран клеток-мишеней могут служить важным звеном в механизмах гормональной регуляции облученного организма.

Циклические нуклеотиды. Важная роль циклических нуклеотидов в радиационном поражении клетки и проявлении радиомодифицирующих свойств многих химических соединений получила широкое освещение в литературе. Известно, что циклонуклеотиды, и прежде всего цАМФ, выступают в качестве основных эффекторов гормональной регуляции количества и активности ферментов, опосредуя

Таблица 9

Активность ферментов плазматических мембран печени крыс,  
облученных на фоне адреналина, мкмоль  $\Phi_H$  (мг белка.ч);

n = 5

| Вариант опыта                             | Время после облучения, ч      |                              |                              |
|-------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                           | I                             | 24                           | 48                           |
| $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATФазa}$ |                               |                              |                              |
| Интakтный контроль                        | 9,9 $\pm$ 0,7                 |                              |                              |
| Облученные                                | 1,3 $\pm$ 0,4 <sup>x</sup>    | 0,9 $\pm$ 0,9 <sup>x</sup>   | 2,1 $\pm$ 0,1 <sup>x</sup>   |
| Адреналин,   неолученные                  | 2,1 $\pm$ 0,7 <sup>x</sup>    | 2,6 $\pm$ 1,1 <sup>x</sup>   | 4,6 $\pm$ 1,9 <sup>x</sup>   |
| 0,3 мг/кг   облученные                    | 2,4 $\pm$ 1,1 <sup>xx</sup>   | 3,2 $\pm$ 0,9 <sup>xx</sup>  | 5,3 $\pm$ 1,8 <sup>xx</sup>  |
| Адреналин,   неолученные                  | 1,5 $\pm$ 0,7 <sup>x</sup>    | 6,6 $\pm$ 0,5 <sup>x</sup>   | 7,4 $\pm$ 1,7                |
| 1,0 мг/кг   облученные                    | 3,2 $\pm$ 0,9 <sup>xx</sup>   | 6,8 $\pm$ 0,5 <sup>xx</sup>  | 10,0 $\pm$ 1,6 <sup>xx</sup> |
| $\text{HCO}_3^- - \text{ATФазa}$          |                               |                              |                              |
| Интakтный контроль                        | 26,5 $\pm$ 2,3                |                              |                              |
| Облученные                                | 6,7 $\pm$ 0,6 <sup>x</sup>    | 7,3 $\pm$ 0,4 <sup>x</sup>   | 8,3 $\pm$ 2,7 <sup>x</sup>   |
| Адреналин,   неолученные                  | 38,2 $\pm$ 1,7 <sup>x</sup>   | 39,9 $\pm$ 3,6 <sup>x</sup>  | 50,4 $\pm$ 6,6 <sup>x</sup>  |
| 0,3 мг/кг   облученные                    | 28,2 $\pm$ 1,4 <sup>xx</sup>  | 38,8 $\pm$ 3,3 <sup>xx</sup> | 40,5 $\pm$ 4,1 <sup>xx</sup> |
| Адреналин,   неолученные                  | 24,1 $\pm$ 2,6                | 25,3 $\pm$ 2,0               | 21,1 $\pm$ 2,1               |
| 1,0 мг/кг   облученные                    | 53,8 $\pm$ 3,2 <sup>xx</sup>  | 21,1 $\pm$ 2,8 <sup>xx</sup> | 30,9 $\pm$ 1,4 <sup>xx</sup> |
| $\text{Mg}^{2+} - \text{ATФазa}$          |                               |                              |                              |
| Интakтный контроль                        | 49,8 $\pm$ 1,5                |                              |                              |
| Облученные                                | 37,1 $\pm$ 0,5 <sup>x</sup>   | 44,5 $\pm$ 1,5               | 51,5 $\pm$ 0,5               |
| Адреналин,   неолученные                  | 56,1 $\pm$ 1,1                | 46,0 $\pm$ 4,3               | 69,4 $\pm$ 9,4 <sup>x</sup>  |
| 0,3 мг/кг   облученные                    | 51,0 $\pm$ 2,4 <sup>xx</sup>  | 53,0 $\pm$ 6,0               | 50,5 $\pm$ 3,8               |
| Адреналин,   неолученные                  | 74,5 $\pm$ 2,3 <sup>x</sup>   | 45,3 $\pm$ 2,0               | 55,5 $\pm$ 1,4               |
| 1,0 мг/кг   облученные                    | 73,1 $\pm$ 2,8 <sup>xx</sup>  | 54,7 $\pm$ 2,4 <sup>xx</sup> | 57,0 $\pm$ 4,9               |
| 5' - нуклеотидаза                         |                               |                              |                              |
| Интakтный контроль                        | 10,2 $\pm$ 1,51               |                              |                              |
| Облученные                                | 27,9 $\pm$ 4,9 <sup>x</sup>   | 63,7 $\pm$ 3,9 <sup>x</sup>  | 46,5 $\pm$ 7,6 <sup>x</sup>  |
| Адреналин,   неолученные                  | 96,3 $\pm$ 9,7 <sup>x</sup>   | 54,2 $\pm$ 6,9 <sup>x</sup>  | 44,3 $\pm$ 8,7 <sup>x</sup>  |
| 0,3 мг/кг   облученные                    | 83,9 $\pm$ 12,5 <sup>xx</sup> | 24,8 $\pm$ 9,5 <sup>xx</sup> | 13,7 $\pm$ 1,8 <sup>xx</sup> |
| Адреналин,   неолученные                  | 57,2 $\pm$ 4,5 <sup>x</sup>   | 66,0 $\pm$ 7,1 <sup>x</sup>  | 95,1 $\pm$ 3,7 <sup>x</sup>  |
| 1,0 мг/кг   облученные                    | 12,1 $\pm$ 0,9 <sup>xx</sup>  | 25,3 $\pm$ 4,0 <sup>xx</sup> | 82,5 $\pm$ 9,0 <sup>xx</sup> |

<sup>x</sup> Различие достоверно по сравнению с результатами, полученными у интактных контрольных животных соответствующей группы.

<sup>xx</sup> Различие достоверно по сравнению с результатами, полученными у облученных животных соответствующей группы.

действие более чем 20 гормонов. Однако при рассмотрении механизмов радиомодифицирующего действия циклических нуклеотидов остается фактически неизученной реакция самой плазматической мембраны, содержащей основные компоненты данных систем.

Нами исследовано влияние экзогенного цАМФ на активность ферментов плазматических мембран клеток печени контрольных и облученных крыс. Свободный циклонуклеотид, растворенный в физрастворе, вводили внутривентриально в дозе 50 мг/кг. Группе животных с облучением цАМФ инъецировали за 25–30 мин до воздействия. Как показывают данные таблицы 10, *in vivo* цАМФ во все периоды наблюдения вызывает существенное ингибирование активности  $\text{Na}^+.\text{K}^+$ -АТФазы изучаемых мембран по отношению к контролю с физраствором. Активность  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы снижалась менее значительно, а  $\text{HCO}_3^-$ -АТФаза оказалась нечувствительной к циклонуклеотиду. Реакция 5'-нуклеотидазы на цАМФ проявлялась лишь через 48 ч после его введения и выражалась возрастанием активности на 58%. Прямое влияние цАМФ на активность мембранных ферментов исследовалось в экспериментах *in vitro*. Чувствительность к непосредственному контакту с цАМФ проявляла только  $\text{Na}^+.\text{K}^+$ -АТФаза. Циклонуклеотид в физиологической концентрации ( $10^{-6}$  моль) снижал активность фермента на 68%, а при  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  моль ее выявлялось менее 20%. Предлучевое применение цАМФ предотвращало блокирование данной АТФазы и поддерживало ее активность на более высоком уровне по сравнению с воздействием одного облучения. Полученные результаты дают основание полагать, что известные радиомодифицирующие эффекты цАМФ, связанные с его влиянием на скорость фосфорилирования мембранных белков, обусловлены изменениями активности натриевого насоса.

Таким образом, комплекс представленных данных свидетельствует о непосредственном участии компонентов плазматической мембраны в механизмах радиомодифицирующего действия различных по природе химических соединений.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексный подход к изучению молекулярных механизмов радиационного поражения плазматических мембран животных клеток, примененный в настоящем исследовании, позволил выявить ряд существенных закономерностей, происходящих в структурной организации и функциональной активности данной мембраны.

Таблица 10

Активность ферментов плазматических мембран печени крыс, облученных на фоне ЦАМФ,

мкмоль  $\Phi_H$  (мг белка.ч);  $n = 5$ 

| Вариант опыта                      | АТФазы                       |                              |                              | 5'-нуклеоти-<br>даза           |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
|                                    | $Na^+, K^+$                  | $Mg^{2+}$                    | $HCO_3^-$                    |                                |
| Контрольные животные:<br>интактные | 12,5 $\pm$ 1,2               | 44,7 $\pm$ 3,6               | 23,8 $\pm$ 1,9               | 8,11 $\pm$ 1,4                 |
| с введением физраствора            | 17,9 $\pm$ 1,9               | 53,2 $\pm$ 4,0               | 28,4 $\pm$ 2,1               | 97,6 $\pm$ 11,1                |
| Через 30 мин после:                |                              |                              |                              |                                |
| введения ЦАМФ                      | 9,03 $\pm$ 0,8 <sup>x</sup>  | 40,7 $\pm$ 4,9               | 20,1 $\pm$ 2,4               | 96,0 $\pm$ 9,2                 |
| облучения                          | 1,30 $\pm$ 0,7               | 32,1 $\pm$ 2,2               | 6,72 $\pm$ 0,8               | 26,8 $\pm$ 3,0                 |
| облучения + ЦАМФ                   | 2,21 $\pm$ 0,9               | 36,2 $\pm$ 3,1               | 14,1 $\pm$ 0,9 <sup>xx</sup> | 101,4 $\pm$ 22,4 <sup>xx</sup> |
| Через 24 ч после:                  |                              |                              |                              |                                |
| введения ЦАМФ                      | 6,04 $\pm$ 0,9 <sup>x</sup>  | 38,7 $\pm$ 4,0 <sup>x</sup>  | 23,9 $\pm$ 1,2               | 95,1 $\pm$ 8,1                 |
| облучения                          | 1,81 $\pm$ 0,3               | 44,5 $\pm$ 3,9               | 7,30 $\pm$ 0,7               | 63,7 $\pm$ 3,9                 |
| облучения + ЦАМФ                   | 3,30 $\pm$ 0,9 <sup>xx</sup> | 31,5 $\pm$ 1,7 <sup>xx</sup> | 13,5 $\pm$ 0,9 <sup>xx</sup> | 84,7 $\pm$ 11,0 <sup>xx</sup>  |
| Через 48 ч после:                  |                              |                              |                              |                                |
| введения ЦАМФ                      | 7,52 $\pm$ 1,1 <sup>x</sup>  | 32,8 $\pm$ 0,9 <sup>x</sup>  | 22,8 $\pm$ 1,1               | 154,2 $\pm$ 19,7 <sup>x</sup>  |
| облучения                          | 2,01 $\pm$ 0,05              | 51,5 $\pm$ 3,7               | 8,32 $\pm$ 0,7               | 46,5 $\pm$ 7,6                 |
| облучения + ЦАМФ                   | 4,25 $\pm$ 0,6 <sup>xx</sup> | 34,5 $\pm$ 0,9 <sup>xx</sup> | 14,6 $\pm$ 0,9 <sup>xx</sup> | 149,3 $\pm$ 22,6 <sup>xx</sup> |

<sup>x</sup> Достоверно от контроля с физраствором.<sup>xx</sup> Достоверно от результатов с облучением.

Значительная часть выполненной работы посвящена изучению липидных компонентов наружной клеточной мембраны, так как именно их перестройки могут создавать основу нарушений структуры, метаболических процессов в мембране и ее функциональных изменений при лучевом поражении. Установлено, что большинство исследуемых липидных показателей претерпевает под действием ионизирующего излучения ранние и существенные изменения, каждое из которых влечет за собой нарушение соответственно регулируемых ими функциональных свойств мембраны. К обнаруженным ответам мембранных липидов на лучевое воздействие относится снижение суммарного объема фосфолипидов, накопление холестерина с соответствующим возрастанием молярного коэффициента холестерина/фосфолипиды, качественные и количественные перестройки индивидуальных фосфолипидов, изменение уровня глицеридов, жирных кислот и их эфиров в общей липидной фазе.

Последствием снижения суммарного количества фосфолипидов после облучения является падение в мембране соотношения липид/белок. Сам по себе этот факт свидетельствует об относительном усилении белковой фазы, что приводит к увеличению жесткости по всему полю (Rottem, Samuni, 1973). На радиационное снижение текучести плазматической мембраны указывает и целый ряд других обнаруженных нами изменений, включающих повышение уровня холестерина и молярного коэффициента холестерин/фосфолипиды, значительное истощение мембраны по легкоокисляемому ФИ, возрастание уровня трудноокисляемого СМ и соотношения СМ/ФХ, а также - резкое падение выявленной нами в данной мембране АОА липидов. Следствием таких перестроек является уменьшение толщины мембраны, ограничение подвижности отдельных участков молекул (Shinitzky, Henkart, 1979), увеличение латеральной сжимаемости и соответственное снижение кооперативности мембраны (Hanberg e.a., 1978).

Результаты исследования лучевого влияния на конформацию плазматической мембраны подтверждают биохимические данные и свидетельствуют о развитии жесткой структурированности белковой фазы, возрастании силы межмолекулярных и гидрофобных взаимодействий, снижении подвижности углеводородных цепей фосфолипидов, усилении водородных связей. Переходом плазматической мембраны на новый структурный уровень с появлением признаков ригидности и соответствующей хрупкости ее построения можно объяснить механизмы ранних лучевых морфологических дефектов

клеточной поверхности. Полученные данные о лучевой трансформации липидного бислоя позволяют интерпретировать и механизмы радиационного нарушения активности мембраносвязанных ферментов.

Сопоставление результатов наглядно демонстрирует корреляцию пострадиационного ингибирования натриевого насоса и других мембраносвязанных ферментов со снижением текучести мембраны и ее липид-белковых соотношений, значительной потерей  $\Phi\text{И}$ , накоплением холестерина и увеличением соотношения  $\text{СМ}/\Phi\text{Х}$ , т.е. набором конкретных показателей, каждый из которых уже сам по себе обуславливает торможение активности многих мембраносвязанных ферментов. С падением или исчезновением АТФазной активности плазматической мембраны замедляется или полностью перестает откачиваться натрий из клетки. Одновременно тормозится активность десятков ферментов, специфичность которых контролируется одновалентными катионами (Болдырев, Твердислов, 1978), и наступает общее подавление клеточного метаболизма. От работы натриевого насоса зависит образование ДНК, поэтому синтез белков и активный транспорт рассматриваются как единая система с обратной связью (Глебов, Крыжановский, 1976). Следовательно, одной из сторон молекулярного механизма радиационного нарушения синтеза ДНК является изменение регуляторных функций плазматической мембраны, осуществляемых через натриевый насос.

Отражением липидных перестроек мембраны служит и существенное лучевое индуцирование активности  $5'$ -нуклеотидазы - другого интегрального фермента наружной клеточной мембраны. Являясь эктоэнзимом, данная фосфогидролаза представляет собой комплекс, ассоциированный с фосфолипидами наружной стороны бислоя (Merisko с.а., 1981). Корреляция высокого уровня активности  $5'$ -нуклеотидазы после облучения с приростом в мембране  $\text{СМ}$ , влияющего на ее стабильность, а также - с увеличением концентрации холестерина и снижением массы фосфолипидов свидетельствует в пользу тесной зависимости деятельности данного фермента от состояния липидного микроокружения. Значительным возрастанием  $5'$ -нуклеотидазной активности сопровождаются многие заболевания, подавление иммунологической реактивности организма облучением (Туманян, Кирилличева, 1984). Учитывая, что данная фосфогидролаза участвует в продукции аденозина, метаболизме пуринов, пиримидинов, в стимулированном  $5'$ -АМФ накоплении цАМФ и биосинтезе нуклеиновых кислот (Edwards с.а., 1982), обнаруженное возрастание активности фермента может характеризовать

нарушение всех вышеуказанных процессов в клетках облученного организма.

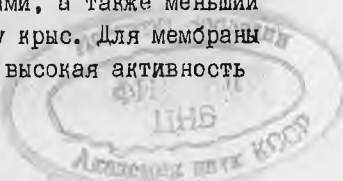
Примечательно выявление в плазматической мембране собственной антиокислительной активности липидов, уровень которой рассматривается в качестве решающего фактора, определяющего степень вовлеченности мембраны в процесс радиационной гибели клетки. Известно, что устойчивое к действию облучения состояние клеточного метаболизма характеризуется и высокими величинами АОА (Бурлакова и др., 1975). Антиокислительные свойства липидов, обеспечивающие стационарность окислительных процессов, относятся к первичным механизмам гомеостаза мембраны (Аристархова и др., 1976). В наших экспериментах наблюдалась корреляция между постлучевыми показателями АОА и рядом параметров липидного бислоя. Раннее падение величины АОА липидов сочеталось со снижением показателя липид-белок и выходом из мембраны  $\text{CH}_3$ . Уменьшение ненасыщенности липидной фазы и обогащение ее устойчивыми к окислению фракциями ( $\text{CM}$ , холестерин) наиболее выражено при самых низких значениях АОА. Окисление свободных жирных кислот и накопление их эфиров более заметны в ближайшие сроки после облучения, когда уровень АОА резко падал. Следовательно, можно полагать, что радиационное нарушение стационарности в организации липидного бислоя плазматической мембраны во многом определяется изменением состояния ее биоантиоксидантов и проявляемой ими антиокислительной активности.

Отмеченное радиационное возрастание микровязкости плазматической мембраны и развитие ее жесткой структурированности предопределяет снижение доступности полиненасыщенных ацилов и соответственно скорости аутоокисления мембранных липидов. Действительно, эксперименты показали, что в свежeweделенных из облученного организма фракциях изучаемых мембран значительно снижалось аутоокисление липидов и концентрация  $\text{MDA}$  - продукта их свободнорадикального окисления. В ранние периоды после лучевого воздействия не повышалась скорость ферментативной ( $\text{NADPH-H}$ -зависимой) и неферментативной (аскорбат-зависимой) индукции свободнорадикального окисления. Все это свидетельствует о способности плазматической мембраны в условиях облучения эффективно защищать собственные липиды от перекисления, а также указывает на существование в мембране ингибиторов свободнорадикального окисления.

Согласно современным представлениям, регуляция свободнора-

дикального окисления липидов может осуществляться защитными антиоксидантными системами. Нашими исследованиями выявлено, что кроме АОА липидов в плазматической мембране присутствуют специализированные ферментные системы антирадикальной защиты и восстановленный глутатион. Результаты изучения данных систем плазматической мембраны свидетельствуют о сопряженности их работы в наиболее ранние периоды после облучения. Следовательно, плазматическая мембрана способна к защите клетки от свободных радикалов на ранних этапах лучевого поражения путем регулирования свободнорадикального окисления липидов, что может свидетельствовать о ее репарирующих свойствах. Об этом же говорит нормализация коэффициента насыщенности липидного бислоя, а также тенденция к возврату на исходный уровень величины АОА липидов. К адаптивному ответу мембраны на общее лучевое воздействие относится и накопление в ней свободного холестерина, который, влияя на микровязкость, содействует стабилизации мембраны, снижению скорости перекисления липидов (Владимиров, 1982). Лучевые перестройки главных фосфатидов плазматической мембраны (ФХ, СМ, ФЭ) с увеличением вклада полиненасыщенных жирных кислот способствуют поддержанию необходимой степени вязкости углеводородной части липидного бислоя, что также можно отнести к адаптивным явлениям.

Существенной предпосылкой для реализации лучевых повреждений клетки является непосредственное участие в этом процессе ее важнейших структур. Универсальная регуляторная роль плазматической мембраны, ее структурная лабильность предполагают значимость лучевых повреждений и репаративных возможностей этого мембранного образования не только в жизнеспособности облученной клетки и организма, но и в определении природной и модифицированной радиочувствительности. Проведенное нами сравнительное исследование плазматических мембран клеток печени животных, отличающихся степенью радиочувствительности, позволило определить различия в исходных параметрах ряда липидных компонентов, активности мембраносвязанных ферментов и конформационных признаков мембраны. Оказалось, что плазматическим мембранам клеток более радиочувствительных морских свинок присущи низкие показатели активности интегральных ферментов по сравнению с крысами и золотистыми хомячками, а также меньший уровень холестерина и фосфолипидов, чем у крыс. Для мембраны золотистых хомячков характерным является высокая активность



ионтранспортирующих АТФаз. ИК-спектроскопическими исследованиями установлено, что мембрана морской свинки, в отличие от крысы, представляет собой менее стабильную аморфную липопротеиновую структуру с меньшим количеством РО-связей, возможно обусловленным более низким содержанием в них липидного фосфора.

Выявлено, что общее облучение в равноэквивалентных дозах, соответствующих  $ДД_{30/30}$ , вызывает неоднотипный ответ плазматических мембран клеток изучаемых животных. Для мембраны относительно радиостойчивых золотистых хомячков характерным в условиях облучения является возрастание активности натриевого насоса, снижение концентрации холестерина и отсутствие изменений  $5'$ -нуклеотидазной активности, что противоположно реакции мембраны крыс. Поверхностная мембрана клеток радиочувствительной морской свинки резко истощается по холестерину и фосфолипидам с одновременным ингибированием активности ее специфических ферментов.

Как видно, механизмы адаптивной реакции плазматической мембраны более радиорезистентного животного направлены на увеличение текучести липидного бислоя и усиление активных транспортных процессов, что предполагает ответное возрастание функциональной активности мембраны и клетки в целом. Картина ультраструктурных изменений клеток печени золотистых хомячков при аналогичном лучевом воздействии также свидетельствует о повышении метаболических процессов в гепатоцитах, характерном для состояния гиперактивности (Черных, 1973). Прогрессивное снижение количества главных структурных липидов и разное торможение активности интегральных ферментов в изучаемых мембранах морской свинки характеризуют глубокие и необратимые структурно-метаболические нарушения. Полученные результаты могут послужить основой для дальнейшего изучения механизмов клеточной и видовой радиочувствительности на уровне мембранных систем.

Плазматическая мембрана служит обязательным посредником всех клеточных реакций, возникающих в ответ на поступление в организм любого химического вещества. Действие химического агента формирует структурные и функциональные перестройки мембраны, что должно находить отражение в широком спектре регулируемых ею метаболических процессов и особенно важно при разработке вопросов химической радиомодификации. С этих позиций выяснение механизмов действия химических модификаторов на клеточную поверхность весьма перспективно в области прикладной

радиобиологии, связанной с решением задач противолучевой защиты и лучевой терапии опухолей.

В наших экспериментах с использованием МЭА - одного из эффективных радиопротекторов тиолового ряда и биологически активных соединений, обладающих протекторными свойствами (цАМФ и адреналин), прослежена реакция плазматической мембраны на введение данных препаратов отдельно и в совокупности с общим облучением. Оказалось, что МЭА *in vivo* и *in vitro* значительно подавляет активность всех изучаемых ферментов мембраны клеток печени крысы. Разрозненные отрицательные эффекты "чистого" облучения и введения только цистеамина снимались предлучевой инъекцией данного протектора. В качестве возможного механизма ингибирования цистеамином активности ферментов наружной клеточной мембраны, по-видимому, может выступать его дестабилизирующее действие на липидный бислой, с которым он непосредственно взаимодействует (Kranck e.a. , 1981), а также кратковременное блокирование тиогрупп активного центра ферментов (Bird, 1980).

С обнаруженным резким ингибированием под влиянием МЭА функций  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{--ATPase}$  и 5'-нуклеотидазы плазматических мембран могут быть связаны известные токсические эффекты данного соединения на центральную нервную систему, так как вышеуказанные ферменты играют существенную роль в нейромодуляции, проведении нервного импульса и течении биохимических процессов в нервной клетке (Reddington e.a. , 1982). На основе наших исследований можно интерпретировать механизм взаимодействия радиопротекторов аминокислотного ряда с ДНК, осуществляемого через клеточную поверхность (Kranck e.a. , 1981). Не исключено, что радиопротектор, связываясь непосредственно с полярной частью липидного бислоя, вызывает его перестройку, что отражается на активности натриевого насоса, аденилатциклазы и 5'-нуклеотидазы плазматических мембран, имеющих прямое отношение к обмену и синтезу ДНК.

Реализация действия цистеамина и ряда других серусодержащих протекторов связана с мобилизацией в организме катехоламинов, в том числе адреналина, а также его посредника - цАМФ (Соболев, 1981; Кулинский, 1983). Вместе с тем катехоламины и циклонуклеотиды сами в определенных дозах проявляют свойства радиопротекторов (Fremuth e.a. , 1978). Нами выявлена общность мембранных реакций на предлучевое введение животным данных физиологически активных соединений и МЭА. Обнаружен значительный

ингибирующий эффект адреналина и цАМФ на деятельность натриевого насоса. Упытами *in vitro* подтверждено непосредственное влияние этих соединений на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Предлучевое применение гормона и цАМФ предотвращало блокирование натриевого насоса, наступающее под влиянием одного облучения. Сочетание каждого соединения с облучением оказывало положительное действие и на активность других исследованных ферментов плазматической мембраны. Следовательно, несмотря на различную проникающую способность, все примененные модификаторы действовали однотипно, снижая мембранную радиопоражаемость. В связи с тем, что деятельность мембраносвязанных ферментов зависит от окружающей их микросреды, можно предполагать, что механизмы радиомодифицирующего эффекта различных по своим свойствам химических соединений имеют общность и во многом обусловлены первичными структурными и последующими функциональными перестройками плазматической мембраны.

В настоящее время накоплена обширная информация, демонстрирующая явление радиомодификации непроникающими в клетку агентами и мембранотропными соединениями (George e.a., 1980; Srinivasan e.a., 1983; Фоменко, Акоев, 1984). Не исключено, что в этих случаях повышение или снижение выживаемости клетки и ее радиочувствительности достигается путем ослабления или усиления повреждаемости плазматической мембраны. Следовательно, подбирая адекватные реагенты, временно стабилизирующие жидкостную структуру поверхностной мембраны, с целью предотвращения ее ранних перестроек и их последствий, можно изменять радиочувствительность клетки.

Результаты исследований, изложенные в настоящей работе, позволяют составить представление о механизмах действия ионизирующего излучения на один из важнейших компонентов клетки - плазматическую мембрану. Наши данные еще раз демонстрируют известное положение о том, что далеко не все радиобиологические явления на уровне клетки имеют в своей основе поражение генетического аппарата. Анализ структурных и функциональных изменений, происходящих в плазматической мембране, показал, что они могут вносить существенный вклад в радиационное поражение клетки, а также в выяснение механизмов видовой и модифицированной радиочувствительности. Это дает основание надеяться, что настоящее исследование послужит стимулом для успешного развития радиационной мембранологии и ляжет в основу создания прин-

ципиально новых подходов к решению фундаментальных и практических задач радиобиологии.

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментально (на модели клеток печени) доказано, что общее рентгеновское облучение животных в ЛД<sub>50/30</sub> вызывает нарушение структуры и функций плазматических мембран на уровне состава липидной фазы, конформации белковой и липидной компонент, активности мембраносвязанных ферментов. Ранняя постлучевая трансформация липидного бислоя сопровождается падением соотношения липид/белок, возрастанием уровня свободного холестерина, снижением количества суммарных фосфолипидов. Изменение содержания индивидуальных фосфатидов носит двунаправленный характер: выход из мембраны ФМ и ФХ компенсируется приростом уровня ФС, ФЭ и СМ.

2. Обогащение плазматической мембраны свободным холестерином, возрастание молярного коэффициента холестерин/фосфолипиды, деградация легкоокисляемого ФМ, повышение соотношения СМ/ФХ, обнаруженные в пострadiационном периоде, свидетельствуют о снижении текучести и кооперативности мембраны, образовании в ней дополнительных водородных связей, торможении активных транспортных процессов.

3. Выявлено раннее (через 10 мин после облучения) снижение ненасыщенности общей липидной фазы, обусловленное деградацией длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот. Последующая нормализация уровня насыщенности бислоя определялась увеличением доли полиненасыщенных углеводородных остатков в молекулах главных фосфатидов — ФХ, СМ, ФЭ и отражала способность плазматической мембраны к репарации.

4. Определены пострadiационные конформационные перестройки плазматической мембраны, свидетельствующие о развитии жесткой структурированности и дестабилизации белковой фазы, возрастании межмолекулярных гидрофобных взаимодействий, снижении подвижности углеводородных цепей фосфолипидов, усилении водородных связей, нарушении количественного соотношения липид/белок. Полученные ИК-спектроскопические данные сопоставимы с обнаруженными изменениями биохимических показателей и демонстрируют радиационные структурные переходы в плазматической мембране.

5. В плазматической мембране обнаружена антиокислительная

активность липидов. Ионизирующее излучение вызывает раннюю и резкую потерю данной активности с последующей тенденцией к восстановлению. Наибольшее падение величины АОА коррелирует со снижением показателя липид/белок, обогащением мембраны устойчивыми к окислению фракциями (холестерином, СМ), снижением уровня ФН и ненасыщенности общей липидной фазы, окислением свободных жирных кислот и накоплением их эфиров. Приведенные данные дают основание полагать, что радиационное нарушение стационарности и текучести липидного бислоя плазматической мембраны во многом определяется уменьшением величины антиокислительной активности.

6. Выявленное отсутствие постлучевого накопления в плазматической мембране малондиальдегида, постоянство скорости ферментативной (НАДФ-Н-зависимой) и неферментативной (аскорбат-зависимой) индукции свободнорадикальных процессов в ранний период, а также снижение интенсивности аутоокисления липидов демонстрируют способность мембраны к эффективной защите собственных липидов от перекисления.

7. Установлено, что в плазматической мембране локализованы специализированные системы антирадикальной защиты, включающие глутатионпероксидазу, глутатионредуктазу, супероксиддисмутазу, липидсвязанную и водорастворимую каталазу, а также восстановленный глутатион. Взаимозависимые постлучевые изменения активности данных антиоксидантных ферментных систем и содержания восстановленного глутатиона на ранних этапах лучевого поражения раскрывают способность плазматической мембраны защищать клетку от свободных радикалов.

8. Показано, что ионизирующее излучение вызывает изменение активности ряда мембраносвязанных ферментов. Обнаруженное значительное ингибирование деятельности натриевого насоса и бикарбонатстимулируемой АТФазы, а также возрастание активности 5'-нуклеотидазы может лежать в основе механизмов радиационного нарушения катионного и анионного гомеостаза клетки и метаболических процессов, связанных с нуклеиновым обменом. Выявленные сдвиги ферментативных характеристик коррелируют с качественными и количественными переходами структурных липидных компонентов изучаемой мембраны и в большой степени обусловлены повышением микровязкости липидного бислоя.

9. Обнаружены различия в исходных параметрах активности ряда ферментов, содержания липидных компонентов и конформацион-

ных признаках плазматических мембран клеток печени животных, отличающихся степенью радиочувствительности. Выявлено, что общее рентгеновское облучение в равноэквивалентных дозах, соответствующих ДД<sub>50/30</sub>, вызывает неоднотипный ответ плазматических мембран крысы, морской свинки и золотистого хомячка. Анализ полученных результатов дает основание полагать, что механизмы адаптивной лучевой реакции плазматической мембраны относительно радиоустойчивого золотистого хомячка направлены на повышение ее функциональной активности, в то время как для мембраны радиочувствительной морской свинки характерны глубокие структурно-функциональные нарушения.

10. Установлено, что предлучевое применение цистеамин (МЭА), цАМФ и адреналина в радиозащитных дозах приводит к нормализации или предохраняет от резких изменений активность интегральных ферментов плазматической мембраны, т.е. вызывает снижение ее радиопоражаемости. Результаты проведенных экспериментов по изучению отдельного ( *in vivo* , *in vitro* ) и сочетанного с облучением действия данных препаратов на функционирование плазматической мембраны позволяют считать ее важным звеном в механизме действия химических радиомодификаторов различных классов на клетку.

11. Анализ экспериментального материала раскрывает сложные стороны молекулярных механизмов радиационного поражения плазматической мембраны и свидетельствует о возникновении в ней комплекса структурных и функциональных перестроек, которые могут вносить существенный вклад в лучевое повреждение клетки. Результаты исследования способствуют созданию принципиально новых подходов к раскрытию вопросов фундаментальной радиобиологии. Полученные данные в совокупности с литературными сведениями позволяют предполагать, что разработка направленных изменений молекулярной организации и функционального состояния плазматической мембраны может оказаться перспективной в решении задач прикладной радиобиологии, связанных с определением параметров радиочувствительности и путей ее модификации.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Активность некоторых ферментов плазматических мембран печени облученных крыс. - В кн.: Матер. Второго Всесоюз. симп. по мед. энзимологии. Душанбе, 1974, с. 160-161.

2.  $\text{HCO}_3^-$ -стимулируемая аденозинтрифосфатаза плазматических мембран опухолевых клеток. - В кн.: Тез. научн. сообщ. 3 Всесоюз. биохим. съезда. Рига, 1974, с. 290. Совместно с А.Т.Иващенко, А.А.Жубановой, Б.С.Балмухановым.

3. Стимулированная бикарбонатом аденозинтрифосфатаза мембраны эритроцитов крысы. - Вopr. мед. химии, 1975, т. 21, № 5, с. 492-494. Совм. с А.Т.Иващенко.

4.  $\text{HCO}_3^-$ -чувствительная аденозинтрифосфатаза клеток асцитных опухолей. - Биохимия, 1975, т. 40, № 3, с. 629-633. Совм. с А.Т.Иващенко, А.А.Жубановой, Б.С.Балмухановым.

5. Холестерин и фосфолипиды плазматических мембран печени облученных крыс. - В кн.: Матер. 2 Всесоюз. симп. "Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животных и человека". М., 1975, с. 89.

6. Аниончувствительная аденозинтрифосфатаза клеток печени крысы. - Вестн. АН КазССР, 1975, № 10, с. 72-74. Совм. с А.Т.Иващенко, А.А.Жубановой, Б.С.Балмухановым.

7. Действие рентгеновского облучения на  $5'$ -нуклеотидазную активность плазматических мембран печени крыс. - Радиобиология, 1976, т. 16, № 1, с. 115-117.

8. Каталаза плазматических мембран печени облученных крыс. - В кн.: Матер. 2 конф. биохимиков Ср. Азии и Казахстана. Фрунзе, 1976, с. 141-142.

9. Бикарбонатстимулируемая АТФаза ядер и митохондрий печени крысы. - Вестн. АН КазССР, 1976, № 2, с. 74-76. Совм. с А.Т.Иващенко, А.А.Жубановой, Б.С.Балмухановым.

10. АТФазные системы плазматических мембран печени облученных крыс. - В кн.: Матер. Всесоюз. симп. "Влияние радиации на регуляторные процессы в клетке". Пушкино, 1976, с. 91-92. Совм. с А.Т.Иващенко.

11. Влияние рентгеновского облучения на активность АТФаз плазматических мембран и других субклеточных фракций печени. - Радиобиология, 1976, т. 16, № 5, с. 652-656. Совм. с А.Т.Иващенко.

12. Реакция аденозинтрифосфатазной активности клеточных фракций печени на рентгеновское облучение. - В кн.: Матер. Всесоюз. конф. "Механизмы действия радиации на мембраны и возбудимые системы". Тбилиси, 1976, с. 27-28. Совм. с А.Т.Иващенко.

13. Некоторые механизмы различной радиочувствительности

тканей организма. - В кн.: Радиационные исследования, т. III. Тбилиси: Мецниереба. 1978, с. 133-149. Совм. с С.Б.Балмухановым, А.Т.Иващенко, А.Б.Черных, Б.С.Балмухановым.

14. Активность АТФаз плазматических мембран печени облученных крыс на фоне введения адреналина. - В кн.: Магер. Всесоюз. симп. "Роль и механизмы действия биологически активных соединений в гамма-облученном организме". Пушино, 1978, с. 40. Совм. с А.Т.Иващенко.

15. Реакция плазматических мембран на облучение. - Информ. бюл. Радиобиология, 1979, вып. 22, с. 42-44.

16. Адреналин и активность ферментов плазматических мембран. - В кн.: Тез. научн. сообщ. IV Всесоюз. биохимического съезда. Л., 1979, т. 2, с. 54. Совм. с А.Т.Иващенко, Т.Э.Старовой, Т.В.Цветковой.

17. Модификация адреналином лучевой реакции аденозинтрифосфатаз плазматических мембран. - Радиобиология, 1980, т. 20, № 4, с. 589-592. Совм. с А.Т.Иващенко, Т.Э.Старовой.

18. Влияние адреналина на активность АТФаз плазматических мембран печени крыс. - Вopr. мед. химии, 1980, т. 26, с. 308-312. Совм. с А.Т.Иващенко.

19. Модификация цАМФом радиочувствительности плазматических мембран. - В кн.: Тр. IV Всесоюз. симп. "Теоретические основы модификации радиочувствительности". Алма-Ата: Наука, 1981, с. 118-120.

20. Плазматические мембраны клеток опухолей с различной скоростью роста. - Там же, с. 121-124. Совм. с Т.А.Балахчи, Т.В.Цветковой.

21. Активность АТФаз плазматических мембран опухолевых клеток в процессе роста. - Там же, с. 124-127. Совм. с Т.В.Цветковой, Т.А.Балахчи, Е.И.Шараповой.

22. Активность 5'-нуклеотидазы плазматических мембран печени облученных крыс на фоне введения цАМФ. - Информ. бюл. Радиобиология, 1981, вып. 24, с. 15-16. Совм. с Т.Э.Старовой, Т.В.Цветковой.

23. Характеристика систем перекисления мембранных фосфолипидов. - В кн.: Тез. докл. научно-теор. конф. Пермь, 1981, с. 75. Совм. с В.П.Верболович, Т.В.Цветковой, Е.П.Петренко, Т.А.Балахчи.

24. Защита циклическим 3', 5'-АМФ активности АТФаз плазм-

матических мембран печени облученных крыс. - Информ. бюл. Радиобиология, 1981, вып. 24, с. 13-15. Совм. с А.Т.Ивашенко, А.Б.Черных.

25. Plasma membranes of cells with different growth rate. - *Studia biophysica*, 1981, v.86, N 1, p.29-30. In common with T.A.Balakhchy, T.V.Tzvetkova.

26. Чувствительность к ЦАМФ мембраносвязанных ферментов. - В кн.: Тез. докл. III Конф. биохимиков Ср. Азии и Казахстана. Т.2, Душанбе: Дониш, 1981, с. 176. Совм. с Т.В.Цветковой, А.Б.Черных.

27. Сравнительная характеристика плазматических мембран печени крыс, морских свинок и золотистых хомячков. - Там же, с. 187, Совм. с Т.В.Цветковой, Т.А.Балахчи.

28. Конформация плазматических мембран и ионизирующая радиация по данным ИК-спектроскопии. - В кн.: Тез. докл. I Всесоюз. биофиз. съезда. Т.2. М., 1982, с.215. Совм. с В.П.Верболович, Э.В.Полетаевым.

29. Системы антирадикальной защиты плазматических мембран в облученном организме. - Радиобиология, 1983, т. 23, № 5, с. 648-650. Совм. с В.П.Верболович, Е.П.Петренко, Т.В.Цветковой, Т.А.Балахчи.

30. Исследование липидной и белковой компоненты плазматических мембран. - В кн.: Тр. Ин-та физиологии АН КазССР. Алма-Ата, 1982, Деп. в ВИНТИ 17.10.83 г., № 6164-83, с. 73-80. Совм. с С.Ч.Ким, Т.А.Балахчи.

31. Исследование плазматических мембран печени животных с различной радиочувствительностью. - В кн.: Механизмы лучевой патологии. М.: Изд-во МГУ, 1984, с. 44-48. Совм. с Т.В.Цветковой, Т.А.Балахчи, Е.И.Шараповой.

32. Радиационные эффекты в плазматических мембранах по данным ИК-спектроскопии. - Радиобиология, 1984, т. 24, № 2, с. 227-230. Совм. с В.П.Верболович, Э.В.Полетаевым.

33. Модификация цистеамином (МЭА) радиочувствительности плазматических мембран. - Изв. АН КазССР. Сер. биол., 1984, № 2, с. 18-22. Совм. с Т.В.Цветковой, С.Ч.Ким.

34. Влияние облучения на липидный состав плазматических мембран клеток печени. - Радиобиология, 1984, т. 24, № 5, с. 650-651. Совм. с Т.А.Балахчи.

35. Радиационные эффекты плазматических мембран и модификация их биологически активными веществами. - Информ. бюл.

Радиобиология, 1984, вып. 29, с. 28-29.

36. Антиокислительная активность липидов плазматических мембран клеток печени и ее изменение после облучения. - Радиобиология, 1985, т. 25, № 1, с. 87-88. Совм. с Т.В.Цветковой, Т.А.Балахчи.

37. Действие ионизирующей радиации на жирнокислотный состав липидов плазматических мембран клеток печени. - Радиобиология, 1985, т. 25, № 3, с. 397-399. Совм. с Т.А.Балахчи.

38. О роли плазматических мембран в радиационной гибели клеток. - Информ. бюл. Радиобиология, 1985, вып. 31, с. 95-96.

39. Плазматические мембраны при злокачественном росте. - В кн.: Лучевая терапия и клиническая радиобиология. Алма-Ата, 1985, с. 165-174.

40. Радиационная биология плазматических мембран. М.: Энергоатомиздат, 1986, 128 с.

Удостоверения на рационализаторские предложения, выданные Институтом зоологии АН КазССР.

1. Машинка для измельчения тканей. - № 12 от 04.04.83 г.

2. Алюминиевый блок для сжигания липидных проб. - № 10 от 04.04.83 г. Совм. с С.М.Медведским.

3. Устройство для автоматического покрытия адсорбентом хроматографических пластинок. - № 50 от 22.03.85 г. Совм. с Т.А.Балахчи.

4. Приспособление для эффективного нанесения липидного экстракта на хроматографическую пластинку. - № 51 от 22.03.85 г. Совм. с Т.А.Балахчи.

Подписано в печать 19.05.86. УГ 14242.

Формат 60x84<sup>1</sup>/16. Бум.тип. № 1.

Офсетная печать. Усл.п.л. 2,4.

Усл.п.кр.=отт. 2,4. Уч.изд.-л. 2,6.

Тираж 100. Заказ 719.

Типография издательства "Наука" Казахской ССР  
480021, г.Алма-Ата, Шевченко, 28