



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **28193** (13) **U**
(51) МПК (2006)
G01N 33/483МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН**

1

2

(21) u200709028

(22) 06.08.2007

(24) 26.11.2007

(72) СІРЕНКО ОЛЕНА ВІТАЛІЙВНА, UA, ЖУКОВ
ВІКТОР ІВАНОВИЧ, UA, ЖУРОВА ТЕТЯНА
ЕДУАРДІВНА, UA(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ, UA

(56)

(57) Спосіб діагностики структурно-
функціонального стану цитоплазматичних

мембран шляхом дослідження біологічного матеріалу та визначення його структури, який **відрізняється** тим, що проводять біохемілюмінесцентні та фосфоресцентні дослідження, на основі змін співвідношення інтенсивності спалаху світіння та кінетики реакції оцінюють наявність та ступінь пошкодження ліпідно-білкового шару цитоплазматичних мембран.

Корисна модель відноситься до експериментальної медицини, у тому числі, патологічної фізіології та може бути використана у клінічній фізіології, терапії та профілактичній медицині.

Сучасні уявлення про патологічні та донозологічні стани спираються на провідну роль структурно-функціональних одиниць організму, як цілісної системи у підтриманні динамічної гомеостатичної рівноваги та здатності адаптуватися до змін внутрішнього та навколишнього середовища [Рахманин Ю.А., Новиков СМ., Румянцев Г.И. Методологические аспекты оценки риска для здоровья населения при кратковременных и хронических воздействиях химических веществ, загрязняющих окружающую среду// Гигиена и санитария. - 2002. - №6. - С.5-7.].

Відомим є спосіб оцінки структури цитоплазматичної клітинної мембрани, який здійснюють шляхом електронної мікроскопії, яка дозволяє визначити кількість слоїв мембрани та наявність їх помітних ушкоджень [Казначеев В.П., Михайлов Л.П. Сверхслабые излучения в межклеточных взаимодействиях// Новосибирск: Наука, 1981. - 144с].

Після фіксації та фарбування ультра тонких мембранних зрізів на електронних мікрофотографіях можна бачити три шари: два темних та один світлий товщиною 10нм. Білково-ліпідні комплекси можуть бути визначені у мітохондріальній мембрані, у той же час, недовіком способу є порушення структури

мембрани у процесі фіксації, фарбування та підготовки зразку до дослідження. Оцінити окремо стан ліпідного та білкового компонентів, їх конформаційних змін та окислювальної модифікації білків у динаміці неможливо. Якщо досліджувані структури мають властивості регулярності, то молекулярну будову можна вивчати за допомогою рентгенівських променів, або методу «заморожування-скалування», які є дуже складними у виконанні і також віддзеркалюють структуру мембрани статично. Окремі молекули цитоплазматичної мембрани методом електронної мікроскопії не можуть бути досліджені, тому що препарати потребують фарбування важкими металами та використання підложки.

Найбільш близьким та обраним за прототип є спосіб електронно-парамагнітного резонансу (ЕПР) [Дубинина Е.Е., Бурмистрова Р.О., Хадиев Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белка. Методы ее определения// Вопросы мед. химии. - 1996. - Т.41, Вып.1. - С.24-26.], який засновано на реєстрації резонансного поглинання електромагнітної енергії у сантиметровому діапазоні довжини хвиль речовинами, що вміщують парамагнітні частки.

За цим методом структуру біоматеріалу оцінюють, використовуючи зміни потужності поглинання у зразку при постійній частоті та змінах зовнішнього магнітного поля. Метод дозволяє визначити текучість мембран клітин крові та тканин з використанням спинових зондів та відноситься до прямих способів реєстрації вільно

(13) **U**
(11) **28193**
(19) **UA**

радикальних процесів в організмі. У той же час, він не дає змоги визначити ушкодження цитоплазматичної мембрани у разі відсутності у зразку біоматеріалу неспарених електронів.

Загальним для способу, що пропонується, методу електронної мікроскопії та ЕПР є біоматеріал, який досліджується (кров, гомогенати та зрізи тканин), у той же час, біофізичні методи, за якими оцінювали стан цитоплазматичних мембран, дозволяють досліджувати сироватку та сечу контингенту, який контактує із шкідливими речовинами, робити комплексні висновки відносно ушкоджень як ліпідних, так і білкових мембранних структур та оцінювати їх конформаційні зміни, що віддзеркалюють функціональну активність клітини.

Спосіб, що пропонується, є значно простішим порівняно з електронною мікроскопією та ЕПР та дозволяє комплексно оцінити як ушкодження структури, так і функції біомембран контингенту, що зазнає впливу ксенобіотиків.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран, в якому за рахунок зміни характеру дослідження досягається можливість комплексної оцінки білково-ліпідних сполучень плазматичної мембрани, що дає змогу оцінити її структуру та функцію.

Поставлена задача вирішується в способі діагностики структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран шляхом дослідження біологічного матеріалу та визначення його структури, згідно з корисною моделлю, проводять біохемілюмінесцентні та фосфоресцентні дослідження, на основі змін співвідношення інтенсивності спалаху світіння та кінетики реакції оцінюють наявність та ступінь пошкодження ліпідно-білкового шару цитоплазматичних мембран.

В основі виникнення багатьох патологічних станів лежать порушення мембрани та зміни внутрішньоклітинного метаболізму. Плазматичні мембрани відповідають не тільки за регуляцію транспорту речовин, а також і за підтримку міжклітинних контактів шляхом активації рецепторів та специфічних ділянок ідентифікації. Визначення порушень структури клітинної мембрани є важливим прогностичним компонентом, що набуває особливої актуальності в умовах постійно зростаючого антропогенного навантаження, особливо при тривалому впливі субтоксичних доз ксенобіотиків. Взаємодія між ксенобіотиком та організмом починається з реакції хімічного агента і рецепторів цитоплазматичної мембрани, які є білками або глікопротеїдами, та стає максимальною, коли усі рецептори зайняті хімічною речовиною. Цей процес відбувається при наявності конкурентних властивостей та спорідненості до рецепторів (здатності ксенобіотика зв'язуватися з білками). В залежності від фізико-хімічних властивостей речовини вплив її на рецептори опосередковує структурно-функціональні зміни клітини та її метаболізму [Журавлев А.И. Субстраты и механизмы эндогенной химической генерации возбужденных электронных состояний и сверхслабого свечения в

тканях// Сверхслабые свечения в биологии. -М.: Медицина. - 1972. - №39. - С.17-31.].

Деякі хімічні сполуки мають мембранотропні властивості та здатні індукувати вільнорадикальні процеси, пригнічувати адаптаційні властивості організму та негативно впливати на гомеостаз [Жуков В.И., Зайцева О.В., Пивень В.И. Молекулярные структурно-метаболические механизмы формирования радиомиметических эффектов при действии на организм детергентов// Региональные проблемы охраны здоровья населения Центрального Черноземья. - Белгород, 2000. - С.169-175.]. Все це у повній мірі відноситься до великої групи складних органічних сумішей на основі поліолів, тривалий вплив яких у субтоксичних дозах на цитоплазматичні мембрани вивчали у експерименті.

Стан ліпідного бішару вивчали, визначаючи біохемілюмінесценцію мембран (БХЛ), яка обумовлена вільнорадикальним окисленням ліпідних компонентів клітинних мембран. Здатність до найбільш вираженого світіння належить ліпідам, при цьому для кожного органа або тканини є свої специфічні рівні люмінесценції, що змінюються під впливом різноманітних патогенів або у разі виникнення структурно-метаболических порушень. Хемілюмінесценція гомогенатів тканин або рідин з високою точністю віддзеркалює стан ліпідного шару клітинної мембрани, що забезпечує його гідрофобні властивості та щільність.

У той же час, відомо, що різноманітні функції біомембран обумовлені білками, що входять до їх складу. Мембранні білки розташовані або на поверхні цитоплазматичної мембрани, або у товщі її гідрофобного шару. Однією з особливостей мембранних білків є підвищений вміст гідрофобних кінцівок амінокислот у порівнянні з гідрофільними [Дубинина Е.Е., Бурмистрова Р.О., Хадиев Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белка. Методы ее определения// Вопросы мед. химии. - 1996. - Т.41, Вып.1. - С.24-26]. Для кількісної характеристики фізичних властивостей біомембран (поверхневий заряд, трансмембранний потенціал, в'язкість, конформаційне розташування білків, вміст води) найчастіше використовують флуоресцентні мітки та зонди [Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран// - М.: Наука. -1989. - 320с. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов// - К.: Вища школа, 1989. - 196с].

Текучість та полярність мембран, визначали за ступенем занурення спинові мітки (1,8-АНС) і кількості фотонів, що випромінює біоматеріал, за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника. Якщо текучість цитоплазматичної мембрани зростає внаслідок окислювальної модифікації білків та зниження щільності клітинної мембрани, кількість занурених спинових міток підвищується. Таким чином, показники текучості мембрани реєструються по рівнях фотонів, кількість яких зменшується співвідносно з ступенем пошкодження білкового шару цитоплазматичної мембрани. За цим же принципом пропонується визначати полярність мембран. Гідрофобні

кінцівки амінокислот мембранних білків мають заряд (неполярні), на відміну від полярних гідрофільних. У разі порушення білкового гідрофобного шару клітинної мембрани відбувається гасіння флуоресцентних імпульсів за рахунок підвищення у білково-ліпідному шарі мембрани кількості молекул води.

Своєчасне визначення структурно-функціональних порушень біомембран дозволяє попередити розвиток передпатологічних та патологічних станів у контингенту, що зазнав дії шкідливих речовин.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

Забір венозної крові контингенту, що контактує із шкідливими речовинами, проводять вранці натще, після чого отримують сироватку крові та проводять дослідження біоматеріалу, який термостатують у темновій камері при 37°C, після чого вимірюють власну інтенсивність світіння сироватки крові та індуковану перекисом водню у автоматичному режимі за допомогою автоматичного хемілюмінометра БХЛМЦ 10-1, реєструють спалахи світіння та кінетику реакції протягом 1,5-3 хвилин. При перевищенні контрольних показників визначають наявність активації перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) цитоплазматичних мембран.

Для підтвердження пошкодження мембрани були проведені дослідження на щурах, що отримували органічні речовини із встановленими мембранотропними властивостями (3, 6).

Дослідження 1. - Показники структурно-функціонального стану цитоплазматичних мембран гомогенатів тканин та сироватки крові щурів, що отримували складні органічні суміші на основі поліолів, оцінювали по інтенсивності спонтанної та індукованої H_2O_2 та $FeCl_3$, люмінол-залежної БХЛ (цільної крові, сироватки або сечі) до та після додавання досліджуваного ксенобіотика. Експеримент проведено на 7 групах (по 14 щурів популяції Вістар обох статей) масою 180 ± 10 г, які протягом 45 днів отримували внутрішньошлунково 0,184г/кг охолоджувальної рідини (ОР-40), 0,16г/кг гальмівної рідини «Роса» (ГР) та 0,81г/кг Лапролу 303(Л-303), що дорівнює 1/100 DL_{50} цих речовин. Основним компонентом усіх органічних сумішей були поліоли різних марок. Контрольна група тварин отримувала водопровідну воду. Наприкінці експерименту щурів забивали методом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом. Досліджуючи над слабке світіння, реєстрували спонтанну та індуковану люмінолзалежну люмінесценцію. Як індукент використовували перекис водню та $FeCl_3$. Кванти світла, що випромінюються збудженими молекулами, реєстрували лічильником фотонів після посилення фотоелектронним множителем ХЛМЦ10-1. Під час експерименту у кварцову кювету (10x10x45мм) вводили 1,2мл фізіологічного розчину, 10мкл сироватки або гомогенатів тканин, 10мкл 3% розчину люмінолу, після чого реєстрували фонове світіння - 2 виміри протягом 10 секунд. Індуковану БХЛ виміряли після додавання 0,05мл 3% перекису водню та реєстрації 6 випромінювань, кожне протягом 10

секунд. На основі змін співвідношення інтенсивності спалаху світіння та кінетики реакції оцінювали наявність та ступінь пошкодження ліпідного шару цитоплазматичних мембран (таблиця 1).

Динаміка БХЛ сироватки крові та гомогенатів щурів, що одержували органічні речовини у 1/100

Вид БХЛ	Контроль	
	Л-303	
ВХЛ	123,5 \pm 7,2	242,5 \pm 17,0*
ІХЛ (H_2O_2)	129,5 \pm 14,9	1338,4 \pm 23,5
ІХЛ ($FeCl_3$)	653,6 \pm 11,9	1427,5 \pm 28,6
Люмінол-залежна ІХЛ (H_2O_2)	1791,2 \pm 17,3	3564,7 \pm 44,2
Люмінол-залежна ІХЛ ($FeCl_3$)	1618,4 \pm 23,7	3946,3 \pm 45,5
Гомогенати печінки		
ВХЛ	143,2 \pm 7,9	253,6 \pm 9,8*
ІХЛ (H_2O_2)	798,9 \pm 12,1	1336,5 \pm 15,7
ІХЛ ($FeCl_3$)	795,5 \pm 14,9	1425,4 \pm 21,5
Люмінол-залежна ІХЛ (H_2O_2)	1823,6 \pm 16,8	3817,5 \pm 22,4
Люмінол-залежна ІХЛ ($FeCl_3$)	1746,8 \pm 20,5	3745,9 \pm 25,8
Гомогенати нирок		
ВХЛ	148,9 \pm 6,9	294,3 \pm 20,2*
ІХЛ (H_2O_2)	858,7 \pm 10,94	1465,7 \pm 18,8
ІХЛ ($FeCl_3$)	809,6 \pm 9,8	1428,5 \pm 19,3
Люмінол-залежна ІХЛ (H_2O_2)	1868,7 \pm 21,5	4178,9 \pm 62,3
Люмінол-залежна ІХЛ ($FeCl_3$)	1757,8 \pm 29,6	3951,4 \pm 54,6

Примітка: різниця показників вірогідна, ($p < 0,05$)

Інтенсивність БХЛ біоматеріалу в експериментальних групах перевищувала контрольні показники в усіх випадках, особливо під час реєстрації люмінолзалежної БХЛ (на 2030-2660імг/с). Отримані дані співвідносяться з суттєвою інтенсифікацією вільнорадикальних процесів, які активують ПОЛ клітинної мембрани. Збільшення у тканинах активних форм кисню призводить до пошкодження її білково-ліпідного шару, у тому числі, порушення оптимального співвідношення анаболічних та катаболічних процесів, конформаційних змін мембранних білків.

1. Оцінку окислювальної модифікації мембранних білків виконують за допомогою люмінесцентного комплексу, який складається з фосфороскопу, ртутної лампи, яка генерує світло оптичного діапазону та спектрофотометру (СФ-4). Зразки готують шляхом нанесення на покривне скло сироватки крові людини, що зазнає дії хімічного патогенна, або експериментальної тварини, після чого препарат висушують протягом 30 хвилин при 24°C та помішують у фосфороскоп і проводять дослідження. Використовують спектри збудження (λ -297, 313, 334, 365, 404, 434) протягом 1млсек. Після збудження зразків біологічного матеріалу реєструють показники фосфоресценції. Контролем є препарати сироватки крові людей або тварин, що не зазнали впливу ксенобіотиків. Ступінь пошкодження білкових структур цитоплазматичної мембрани визначають по інтенсивності світіння зразків на

різних хвилях збудження. Інтенсифікація фосфоресценції виникає за рахунок наявності білкових молекул у триплетному стані, наприклад - триптофан і тирозин сироватки крові, які висвітлюють фотон енергії при падінні збудження у відсутності світла оптичного діапазону. Цілісні мембрани відрізняються від пошкоджених значно нижчими рівнями фосфоресценції, що і є діагностичним критерієм. Реєстрація фосфоресценції проводилася на вимірювальному обладнанні, основою якого є фосфороскоп, який забезпечує розділення у часі процесів опромінювання зразка збуджуючим світлом та його фосфоресценції з обов'язковим забезпеченням абсолютного світлозахисту фотоприймача від дифракції збуджуючого світла, чого можна досягнути, використовуючи люменометр [Пат. 2031400 РФ. Устройство для регистрации при комнатной температуре люминесценции биологических мембран // Абашин В.М., Сергиенко Н.Г., Жуков В.И., 1995, Бюл. №8], який забезпечує абсолютний світлозахист фотоелектронного множника та дозволяє реєструвати фосфоресценцію непрозорих зразків.

Для вимірювання фосфоресценції непрозорих зразків на кварцову пластину розміром 15х15мм наносили 50мкл сироватки, які висушували при 30°C у термостаті протягом 20хв до виникнення твердої плівки. Пластина з висушеною сироваткою поміщували у фосфороскоп та виміряли її фосфоресценцію. Джерелом збуджуючого світла була ртутна лампа ДРК-120 монохроматора ДМП-4, виділяли наступні лінії збудження: 297, 313, 334, 365, 404 і 434нм. Ширина вихідної щілини монохроматора складала 2мм, зона спектральної чутливості ФЕМ-300-530нм. Фосфоресценцію реєстрували при кімнатній температурі у режимі підрахунку фотонів. Вимірювальною системою був лічильник СБС-2, усі процеси вимірювань автоматизовані, погрішність складала менше 3% (таблиця 2).

Динаміка фосфоресценції сироватки крові

Спектри збудження (λ)	Контроль	
297	4248,6±68,7	43
313	3248,5±27,8	36
334	618,9±20,3	75
365	1889,5±39,4	20
404	459,7±17,9	63
434	609,6±14,8	82

Примітка: різниця показників вірогідна, (p<0,05)

Інтенсивність фосфоресценції 1-аніліно-8-нафталінсульфата (1,8-АНС), яка змінюється зворотнопропорційно поверхневому заряду мембрани лімфоцита, досліджували за методом Ю.А. Владімірова і Е.Г. Добрецова. Флуоресценцію окремої клітини вивчали за допомогою мікроскопа ЛЮАМ-13, (λ_{зб}=360нм, λ_{ісп}=490нм). Інтенсивність фосфоресценції

віддзеркалювала зростання кількості білкових молекул у триплетному стані під впливом органічних сумішей. Найбільша активація визначалася при коротко- та довгохвильовому збудженні. Така динаміка показників віддзеркалює зміни поверхневого заряду плазматичних мембран, який суттєво знижувався в опитних групах (на 30-95%), що підтверджує збільшення полярності мембран за рахунок дегідратації білкових молекул та накоплення молекул води у мембранних структурах.

Текучість плазматичних мембран клітин крові оцінювали за коефіцієнтом ексімерізації пірена, який є відношенням кількості ексімерів пірена при довжині хвилі λ_{ісп}=470нм до кількості його мономерів при довжині хвилі λ_{ісп}=393нм. Коефіцієнт ексімерізації пірена досліджували в зоні білково-ліпідних сполучень (λ_{зб}=287нм) і в ліпідному бішарі (λ_{зб}=334нм), (таблиця 3).

Текучість мембран лімфоцитів та еритроцитів крові під впливом 1/100 ДЛ50 складних органічних

Речовини	Лімфоцити		Білок-
	Білок-ліпідні сполучення	Ліпідний бішар	
Контроль	3,81±0,09	3,57±0,06	
Л 303	1,73±0,05*	1,85±0,04*	
ГР	1,66±0,03*	1,89±0,05*	
ОР-40	1,64±0,04*	1,75±0,03*	

Примітка: * - розходження показників вірогідні, (p<0,05)

Встановлено зниження текучості та коефіцієнта ексімерізації пірена в цитоплазматичних мембранах клітин крові досліджуваної групи (як у ліпідному шарі, так і у білок-ліпідних сполученнях), особливо виражені в еритроцитарних мембранах. Текучість знижувалась до 50%, при чому максимальне зниження визначене у ліпідному бішарі у той час, як зануреність білків у ліпідний шар клітин крові підвищувалася, що найбільш вираженим було в мембранах еритроцитів.

Отримані дані свідчать про суттєві ушкодження як ліпідних, так і білкових структур плазматичної мембрани під впливом ксенобіотиків. Активація окислювальної модифікації та виникнення конформаційних змін білків цитоплазматичної мембрани підтверджувалися зростанням в усіх випадках рівнів 2,4-дінітрофеніальдогідрозонів та 2,4-дінітрофенілкетогідрозонів (таблиця 4).

Динаміка окислювальної модифікації білків під впливом

Речовини	Показники, М±m	
	2,4-дінітрофеніальдогідрозони (од. опт. густини/г білку, λ-370нм)	(г)
Контроль	21,73±1,82	
Л-303	42,48±1,74*	
ГР	38,95±2,25*	

OP-40	39,82±2,19*	39,60±2,11*
-------	-------------	-------------

Примітка: різниця показників вірогідна, ($p < 0,05$)

Враховуючи наявність у ксенобіотиків гідрофільних груп та гідрофобних радикалів можна припустити їх деструктивну дію на білково-ліпідні комплекси плазматичної мембрани. Наявність високих рівнів збуджених електронних станів підтверджувалася динамікою показників окислювальної модифікації білків та фосфоресценцією сироватки крові. Зникнення сигналу випромінювання квантів світла свідчить про зменшення кількості молекул у триплетному стані. Наявність високих рівнів молекул у збудженому стані, обумовлена присутністю неспарених електронів, підтверджує конформаційні зміни білкових молекул сироватки крові, що виникають внаслідок окислювальної модифікації білків та стимуляції вільно-радикальних процесів у присутності ксенобіотиків.

Отримані за допомогою методів біохемілюмінесценції та фосфоресценції дані щодо впливу складних органічних сумішей на структурно-функціональний стан цитоплазматичної мембрани дозволяє вважати спосіб, що пропонується, неінвазивним, точним та ефективним для оцінки впливу ксенобіотиків на білково-ліпідний шар плазматичної мембрани.