

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

## НАРУШЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ИОНОВ КАЛИЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАДИАЦИИ

*Исследовали влияние электронов с энергией 5 МэВ на проницаемость мембран эритроцитов для ионов  $K^+$ . С использованием перехватчиков продуктов радиолиза воды и SH-активных соединений, показано, что радиационное нарушение транспорта калия связано с повреждением сульфгидрильных групп белков гидроксильными радикалами.*

**Введение.** В формировании радиобиологических эффектов важная роль принадлежит лучевому поражению мембранных систем [1, 2]. Одним из проявлений радиационного повреждения плазматических мембран является усиление выхода внутриклеточного калия [3, 4]. В качестве одной из основных причин нарушения проницаемости мембран для одновалентных катионов в настоящее время рассматривается изменение структуры белковых молекул, обусловленное окислением сульфгидрильных групп при воздействии радиации [5—7]. Вместе с тем, существуют предположения о том, что выход ионов калия из облученных клеток определяется радиационной модификацией физических свойств липидной фазы, в частности, ее полярности и микровязкости [2, 8, 9].

Информативным подходом к выяснению закономерностей лучевого повреждения мембранных компонентов является изучение действия различных физических и химических факторов на характер проявления радиационных эффектов [10]. Ранее было показано, что процесс выхода калия из эритроцитов зависит от температуры инкубации клеток до и после облучения [11].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния химических модификаторов лучевого поражения на проницаемость мембран эритроцитов для ионов  $K^+$ .

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали эритроциты свиньи, отмытые от плазмы путем 3-кратного центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Клетки суспендировали в среде, содержащей 0,15 М NaCl и 5 мМ  $NaH_2PO_4$ , pH 7,4. Гематокрит суспензии эритроцитов был равен 20 %. Концентрацию ионов  $K^+$  во внеклеточной среде определяли с помощью валиномицинового электрода. Температура инкубации эритроцитов 4 °С. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием критерия Стьюдента ( $P=0,05$ ).

Клеточную суспензию, помещенную в цилиндрические ячейки диаметром 6 см и толщиной 1 см, облучали пучком электронов с энергией 5 МэВ на импульсном линейном ускорителе в дозе 500 Гр. Частота следования импульсов составляла 50 Гц. Ток пучка электронов регистрировали с помощью цилиндра Фарадея. Поглощенную дозу рассчитывали по плотности потока электронов.

**Результаты и обсуждение.** Как известно, физико-химические процессы, лежащие в основе лучевого поражения мембран, могут быть следствием прямого действия радиации, обусловленного поглощением энергии ионизирующего излучения мембранными компонентами и/или

опосредованного свободнорадикальными продуктами радиолиза среды повреждения белковых и липидных молекул [12].

Для оценки роли опосредованного действия радиации в нарушении ионной проницаемости мембран эритроцитов было исследовано влияние перехватчиков продуктов радиолиза воды на транспорт калия в облученных клетках. Как следует из представленных в табл. 1 данных, процесс выхода внутриклеточного калия существенно замедляется в присутствии тиомочевины, инактивирующей радикалы  $\text{OH}\cdot$  и гидратированные электроны [10]. Наряду с этим перехватчик гидратированных электронов  $\text{NaN}_3$  не оказывал достоверного защитного действия. Ионол, широко применяемый в качестве ингибитора перекисного окисления липидов (ПОЛ), также ослаблял накопление калия во внеклеточной среде. В то же время, перехватчик синглетного кислорода — азид натрия — несколько усиливал радиационный эффект, возможно, вследствие образования токсичных радикалов при радиолизе молекулы  $\text{NaN}_3$ .

Полученные результаты позволяют предположить, что потеря ионов  $\text{K}^+$  облученными эритроцитами в значительной мере определяется повреждением клеточных мембран гидроксильными радикалами. Известно, что радикалы  $\text{OH}\cdot$  повреждают преимущественно полярную область мембраны, неизбирательно модифицируя внутри- и межмолекулярные связи белков и фосфолипидов [13]. Защитное действие ионола, по-видимому, связано не с ингибированием ПОЛ, а с перехватом радикалов  $\text{OH}\cdot$ , образующихся при радиолизе воды. Участие процессов ПОЛ в нарушении барьерных свойств мембран эритроцитов под влиянием ускоренных электронов представляется маловероятным по двум причинам. Во-первых, для эритроцитов характерно наличие ряда антиокислительных систем [14], что осложняет протекание реакций ПОЛ; во-вторых, многочисленными исследованиями показано, что интенсивность радиационно-индуцированного ПОЛ обратно пропорциональна мощности дозы облучения [1, 2]. При используемом в настоящей работе импульсном режиме облучения средняя мощность дозы достигала 600 Гр/мин, поэтому следует ожидать, что уровень окислительных процессов в липидной фазе мембран будет невысоким.

Модифицирующее влияние на процесс выхода ионов  $\text{K}^+$  из облученных эритроцитов оказывали также SH-активные соединения. Как видно из данных табл. 2, вызванное радиацией изменение проницаемости мембран существенно ослаблялось в присутствии цистамина и дитиотрепто-

Таблица 1

*Влияние перехватчиков свободных радикалов на проницаемость мембран облученных эритроцитов для ионов  $\text{K}^+$*

Перехватчик	Время пострадиационной инкубации клеток, ч	Концентрация внеклеточного калия, мМ	
		Контроль	Облучение
Без добавок	4	4,5±0,5	7,2±0,8
	24	7,6±0,8	16,3±1,7
Тиомочевина, 50 мМ	4	4,5±0,6	5,5±0,6
	24	7,1±0,7	10,5±1,2
$\text{NaNO}_3$ , 10 мМ	4	4,4±0,5	7,0±0,6*
	24	5,9±0,4	14,7±1,6*
$\text{NaN}_3$ , 10 мМ	4	4,4±0,5	13,8±1,5
	24	7,1±0,7	17,9±1,8*
Ионол, 10 мкМ	4	4,8±0,5	6,8±0,8*
	24	7,5±0,8	13,8±1,6

Примечание. В таблице приведены средние значения пяти опытов  $\pm \epsilon = \frac{t_{\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}}$ , где  $S$  — среднее квадратическое отклонение;  $t$  — коэффициент Стьюдента, характерный для доверительной вероятности  $\alpha$  и числа наблюдений  $n$ ; \* значения, достоверно не отличающиеся от контроля, облученного в отсутствие модификаторов.

Таблица 2

Влияние SH-активных модификаторов лучевого поражения на выход ионов  $K^+$  из эритроцитов

Модификатор	Время постра- дационной инкубации, ч	Концентрация внеклеточного калия, мМ	
		Контроль	Облучение
Без добавок	3	$1,2 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,8$
	24	$1,9 \pm 0,2$	$13,2 \pm 1,5$
Цистамин, 5 мМ	3	$1,1 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,4$
	24	$2,1 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,9$
Дитиотреитол, 10 мМ	3	$1,0 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,3$
	24	$1,8 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,6$
ПХМБ, 190 мкМ	3	$2,4 \pm 0,4$	$10,3 \pm 1,2$
	24	$5,0 \pm 0,6$	$15,0 \pm 1,8$

ла. Защитное действие серосодержащего радиопротектора цистамина может быть обусловлено репарацией повреждений, затрагивающих SH-группы белков, или перехватом свободных радикалов, возникающих при радиоллизе среды [10]. Дитиотреитол, разрушая дисульфидные связи, способствует повышению числа экспонированных SH-групп, что приводит к возрастанию радиорезистентности мембранных белков, обеспечивающих перенос ионов  $K^+$ . В то же время *para*-хлормеркурибензоат (ПХМБ), блокируя сульфгидрильные группы, снижает устойчивость белковых молекул к воздействию радиации. Полученные данные служат дополнительным подтверждением гипотезы, объясняющей радиационное усиление выхода калия окислением SH-групп белков [5—7].

В целом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в индуцируемом ускоренными электронами нарушении проницаемости мембран эритроцитов для ионов  $K^+$  существенную роль играют повреждения сульфгидрильных групп белковых молекул гидроксильными радикалами.

В. Д. Крупин, Г. П. Горбенко, С. О. Курилко, В. М. Ткаченко, В. В. Товстяк

#### ПОРУШЕННЯ ПРОНИКНОСТІ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ДЛЯ ІОНІВ КАЛІЮ ПІД ВПЛИВОМ РАДІАЦІЇ

##### Резюме

Досліджено вплив електронів з енергією 5 МеВ на проникність мембран еритроцитів для іонів  $K^+$ . За допомогою інгібіторів продуктів радіолізу води та SH-активних агентів показано, що радіаційне порушення транспорту калію зумовлене пошкодженням SH-груп білків гідроксильними радикалами.

V. D. Krupin, G. P. Gorbenko, S. A. Kurilko, V. N. Tkachenko, V. V. Tovstyak

#### CHANGES OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE PERMEABILITY FOR POTASSIUM UNDER THE INFLUENCE OF RADIATION

##### Summary

The effect of electrons with the energy 5 MeV on the erythrocyte membrane permeability for  $K^+$  has been investigated. Using free radical scavengers and SH-active reagents it was shown that radiation-induced release of intracellular potassium is related to the damage of protein sulfhydryl groups by hydroxyl radicals.

##### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сунгуров А. Ю. Радиобиология клеточной поверхности // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1989.— 179 с.— (С. Радиационная биология; Т. 7).
2. Поливода Б. И., Конев А. В., Попов Г. А. Биофизические аспекты радиационного

- поражения биомембран.—М.: Энергоатомиздат, 1990.—155 с.
3. Charman I., Sturrock M. The effect of X-irradiation *in vitro* on the transport of potassium ions in the thymocytes // *Int. J. Radiat. Biol.*—1972.—22, N 1.—P. 1—9.
  4. Myers D., Bide R. Biochemical effects of X-irradiation on erythrocytes // *Radiat. Res.*—1966.—27, N 2.—P. 250—263.
  5. Shapiro B., Kollmann G. The nature of the membrane injury in irradiated human erythrocytes // *Ibid.*—1968.—34, N 2.—P. 335—346.
  6. Shapiro B., Kollmann G., Asnen J. Mechanism of the effect of ionizing radiation on sodium uptake by human erythrocytes // *Ibid.*—1966.—27, N 1.—P. 139—158.
  7. Герасимова Г. К., Нахильницкая Э. Н. Роль сульфгидрильных групп в радиационном повреждении транспортной функции мембран эритроцитов // Действие ионизирующего излучения на клеточные мембраны.—М.: Атомиздат.—1973.—С. 51—57.
  8. Медведев Б. М., Евтодиенко Ю. В., Кузин А. М. Действие ионизирующей радиации на процессы транспорта ионов в митохондриях печени // *Радиобиология.*—1976.—16, № 5.—С. 756—758.
  9. Bresciani F., Auricchio F., Fiore C. Effect of X-rays on movements of sodium in human erythrocytes // *Radiat. Res.*—1964.—21, N 3.—P. 394—412.
  10. Пределы модифицируемости лучевого поражения / Под ред. П. Г. Жеребченко.—М.: Атомиздат, 1978.—216 с.
  11. Крупин В. Д., Курилко С. А., Ткаченко В. Н. и др. Влияние электронов на транспорт калия в эритроцитах // *Биополимеры и клетка.*—1993.—9, № 3.—С. 54—55.
  12. Кудряшов Ю. Б., Беренфельд Б. С. Основы радиационной биофизики.—М.: Изд-во МГУ, 1982.—303 с.
  13. Фоменко Б. С., Акоев М. I. Радиационное повреждение плазматической мембраны и летальное действие радиации на клетки // *Успехи соврем. биологии.*—1984.—97, № 1.—С. 146—158.
  14. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функция эритроцитарных мембран.—Минск: Наука и техника, 1981.—316 с.

Харьков. гос. ун-т им. А. М. Горького

Получено 15.07.93