

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ДОЗ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ

*А. П. Козлов^а, Е. А. Красавин^б, А. В. Борейко^б,
А. П. Черняев^а, П. Ю. Алексеева^а, У. А. Близнюк^а*

^а Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д. В. Скобельцына
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва

^б Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Проведено исследование повреждения мембран эритроцитов человека при воздействии на суспензию крови γ -излучением в широком диапазоне доз (2–1000 Гр, мощность облучения 2,75 Гр/мин). Показано, что облучение в диапазоне поглощенных доз от 600 Гр и выше ведет к гемолизу эритроцитов сразу (или через несколько часов) после облучения и значение константы скорости гемолиза растет с увеличением поглощенной дозы. Для выявления скрытых повреждений мембран, возникающих через несколько часов после облучения в меньших дозах, на суспензию воздействовали импульсным электрическим полем (ИЭП) большой напряженности. Было показано, что для диапазона поглощенных доз от 2 до ~ 350 Гр не наблюдалось явного увеличения скорости гемолиза эритроцитов после воздействия на суспензию ИЭП по сравнению с необлученной суспензией. Это свидетельствует о том, что в этом диапазоне доз степень повреждения мембран малая и практически не зависит от величины поглощенной дозы. Для доз от 400 до ~ 550 Гр наблюдалось явное увеличение скорости гемолиза после воздействия ИЭП, растущее с величиной поглощенной дозы.

The investigation of erythrocyte membrane damages under the action of γ -radiation in doses of wide range (2–1000 Gy, irradiation power 2.75 Gy/min) was performed. It was shown that the irradiation in the absorbed doses range over 600 Gy results in an immediate (or in a few hours after the radiation) hemolysis of erythrocytes, and the value of the hemolysis rate constant grows with increasing of the absorbed dose. To reveal the hidden membrane damages appearing in a few hours after the smaller doses irradiation the suspension was affected by heavy intensity impulse electric field (IEF). It was demonstrated that for the absorbed doses in the range from 2 to ~ 350 Gy the obvious increasing of the erythrocyte hemolysis rate after the affection IEF on the suspension with the comparison to the unirradiated suspension was not observed. Hence in this dose range the membrane damage degree is small and practically does not depend on the irradiation dose value. For doses from 400 to ~ 550 Gy after the affection of IEF the obvious hemolysis rate growing with the increasing of the irradiation dose value was observed.

PACS: 87.50.Gi

Исследование формирования радиационного повреждения биологических мембран при действии различных видов излучения, в частности γ -излучения, является одной из актуальных задач современной биофизики. В ряде работ рассматриваются механизмы

повреждения мембран под воздействием ионизирующих излучений [1–3]. Для эффектов воздействия на биологические мембраны характерно появление скрытых повреждений [1, 4]. Такие повреждения могут на протяжении длительного времени не обнаруживать себя изменением функционального состояния биологических объектов разной степени сложности. При дополнительных воздействиях (нагревание, повышение парциального давления кислорода, воздействие ультрафиолетового излучения и др.) скрытое повреждение может проявляться. Другой особенностью взаимодействия ионизирующих излучений с биологическими объектами является то, что зависимость биологического эффекта от поглощенной дозы в диапазоне сублетальных (малых) доз носит немонотонный (колебательный) характер, а также связана с мощностью дозы и эволюционирует во времени [1]. Ряд исследователей проводят экспериментальные работы по изучению воздействия на биологические мембраны сверхмалых доз, для которых характерно появление скрытых повреждений [4, 5]. Другие рассматривают действие на мембраны летальных доз, ведущих к разрушению мембран и гибели клеток, то есть вызывающих явные повреждения [6].

Цель данной работы — исследование скрытых повреждений мембран при воздействии γ -излучения в широком диапазоне доз и установление зависимости биологического эффекта от поглощенной дозы излучения.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исследуемой модели использовались клетки крови человека — эритроциты. Общая схема опытов состояла в следующем. Приготавливались четыре образца суспензии эритроцитов в 0,9 % растворе хлористого натрия (с гематокритом 0,2 %). Первый образец служил контролем; второй подвергали воздействию импульсного электрического поля, которое вызывало гемолиз эритроцитов. Третий образец подвергали воздействию γ -излучения и последующему действию импульсного электрического поля; четвертый же только облучали. Затем сравнивали кинетику гемолиза эритроцитов во всех случаях. γ -излучение, действуя на мембраны эритроцитов и разбавленную плазму крови, вызывало неявные, скрытые повреждения мембран. Импульсное электрическое поле, воздействуя на мембраны после облучения, проявляло их скрытые повреждения, изменяя кинетику гемолиза эритроцитов [4, 5].

В качестве источника γ -излучения использовали ^{60}Co , имеющий спектральные линии излучения 1,17 и 1,33 МэВ. Приготовленные образцы суспензии крови человека подвергались воздействию γ -излучения в широком диапазоне доз от 2 до 1000 Гр. Мощность облучения равнялась 2,75 Гр/мин. Дозу облучения устанавливали путем варьирования времени облучения (от нескольких минут до нескольких часов). После чего суспензию термостатировали при температуре 20 °С, что находится ниже точки структурного перехода для мембран эритроцитов [7, 8]. Затем суспензию выдерживали некоторое время, для того чтобы возникшие повреждения мембран могли развиваться, а также для того чтобы проследить эволюцию их повреждений во времени. После чего облученные образцы, получившие различные дозы, подвергали воздействию импульсного электрического поля для выявления скрытых повреждений мембран.

Для электропорации мембран эритроцитов использовали клинический дефибриллятор, с помощью которого получали однополярные электрические импульсы с длительно-

стью ~ 10 мс и с энергией до 300 Дж. Электрический импульс подводили к титановым электродам, которые помещались в кварцевую кювету. В нее наливали 2,4 мл суспензии. Расстояние между силовыми электродами 15 мм. Electroды полностью покрывали боковые стороны кюветы, что обеспечивало однородность создаваемого электрического поля в растворе. В наших экспериментах использовали энергию импульса 180 Дж. При этом характерное время гемолиза эритроцитов в результате электропорации (без облучения) составляло порядка 30 мин.

Скорость гемолиза эритроцитов после электропорации оценивали по изменению оптической плотности образцов с помощью фотоэлектрокалориметра (ФЭК). Ослабление света в результате рассеяния описывается законом Бугера–Ламберта–Бера. Для разбавленной суспензии оптическая плотность D пропорциональна концентрации эритроцитов: $D = Knl$, n — концентрация эритроцитов, l — толщина образца, K — коэффициент пропорциональности. Зависимость $D(t)$ (кинетическая кривая гемолиза) аппроксимировали экспоненциальной функцией:

$$y = y_0 + A_1 \exp(-\beta t), \quad (1)$$

где β — константа скорости гемолиза, y_0 , A_1 , β — параметры кинетической кривой. Всего проведено 76 опытов, результаты которых были обработаны современными методами математической статистики с помощью широко используемых компьютерных программ.

Подробно методика опытов изложена нами ранее в работе [9].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов образцы подвергались облучению в дозах от 2 до 500 Гр (2, 20, 100, 180, 260, 340, 420, 500 Гр). Для этого диапазона доз облученные образцы сохраняли исходное значение оптической плотности, равное 1,0, при толщине слоя 5 мм. То есть после воздействия γ -излучения гемолиз эритроцитов не происходил. Облученные образцы имели несколько повышенное значение начальной (до электропорации) оптической плотности на 5–20% в отличие от контрольной (не облученной) суспензии. Электропорация проводилась через 1 ч и через 1 сут после облучения. На рис. 1, представлены кинетические кривые гемолиза после электропорации, полученные в этой серии экспериментов: электропорация через 1 ч после облучения; электропорация через 1 сут после облучения.

Во второй серии экспериментов воздействовали более высокими дозами облучения — до 1000 Гр (250, 375, 500, 600, 700, 800, 1000 Гр). Образцы, получившие дозы 700–1000 Гр, сразу же после облучения имели значение оптической плотности существенно ниже исходной, что свидетельствовало о полном или частичном гемолизе эритроцитов. В образце, получившем дозу 600 Гр, наблюдалось снижение оптической плотности только через несколько часов после облучения. Электропорация образцов, получивших меньшие дозы, проводилась через 4 ч и через 1 сут после облучения. Для них повреждения являлись скрытыми и не приводили к быстрому гемолизу.

Для анализа полученных результатов были построены кривые зависимости относительных (относительно контроля) констант скорости гемолиза (1) облученных образцов

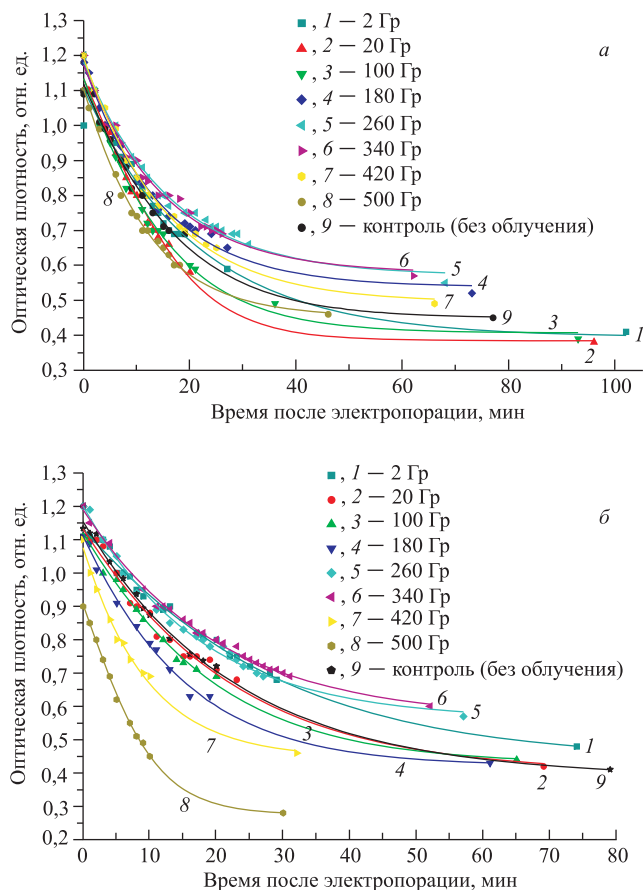


Рис. 1. Кинетические кривые гемолиза эритроцитов при комбинированном воздействии на суспензию γ -излучения (в диапазоне доз от 2 до 500 Гр) и импульсного электрического поля (электропорация). а) Электропорация через 1 ч после облучения; б) электропорация через 1 сут после облучения

от полученной ими дозы γ -излучения для первой и второй серии экспериментов (рис. 2, 3) соответственно. Известно, что повреждения биологических систем развиваются с течением времени после облучения [1]. Поэтому скорость гемолиза после электропорации тоже зависела от того, через какое время после облучения воздействовали импульсным электрическим полем.

Из полученных зависимостей видно, что воздействие γ -излучения на суспензию в дозах до 500–600 Гр не приводило к гемолизу эритроцитов. Также видно, что в широком диапазоне доз (до величины ~ 350 Гр), даже после дополнительного воздействия импульсного электрического поля с целью выявления скрытых повреждений мембран после их облучения, не наблюдалось явного увеличения скорости гемолиза эритроцитов (по сравнению с контролем). Это свидетельствовало о том, что даже большие дозы γ -излучения не приводили к существенным дефектам мембран, которые должны были

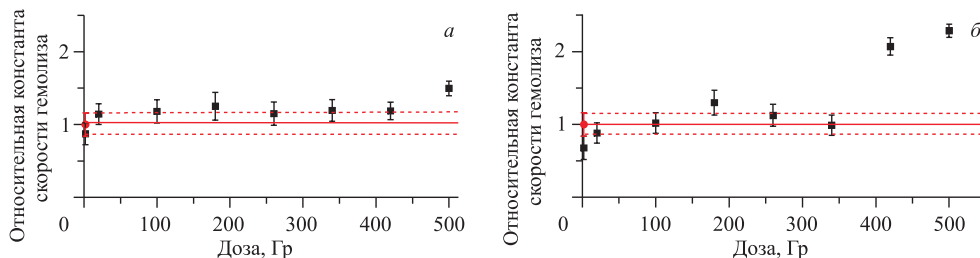


Рис. 2. Зависимость относительной константы скорости гемолиза ($\beta_{\gamma+\text{иЭП}}/\beta_{\text{иЭП}}$) при комбинированном воздействии на суспензию γ -излучения и импульсного электрического поля (ИЭП) от дозы облучения. а) Электропорация через 1 ч после облучения; б) электропорация через 1 сут после облучения

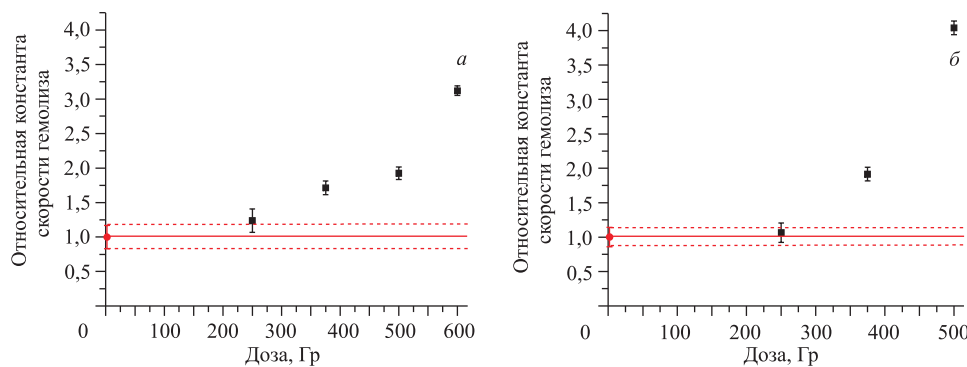


Рис. 3. Зависимость относительной константы скорости гемолиза ($\beta_{\gamma+\text{иЭП}}/\beta_{\text{иЭП}}$) при комбинированном воздействии на суспензию γ -излучения и импульсного электрического поля (ИЭП) от дозы облучения. а) Электропорация через 4 ч после облучения; б) электропорация через 1 сут после облучения

проявиться при электропорации. Незначительные изменения скорости гемолиза после электропорации лежали в пределах ошибки эксперимента. Они носили характер немонотонных колебаний возле контроля, зависимых от дозы. Это, скорее всего, указывает на то, что в мембранах после облучения происходили сложные процессы, носящие отчасти флуктуационный характер.

И только образцы, получившие дозы порядка 350–550 Гр, показали заметное увеличение скорости гемолиза после электропорации (в 1,5–2 раза) относительно контроля и увеличение ее с ростом поглощенной дозы. Это свидетельствовало о наличии скрытых дефектов мембран, которые проявились при электропорации. Здесь важно подчеркнуть, что количество и степень повреждений были пропорциональны поглощенной дозе излучения в отличие от этих показателей в вышеуказанном диапазоне.

При этом, как было сказано выше, гемолиз эритроцитов после облучения не происходил, и облученные образцы в течение длительного времени поддерживали значение оптической плотности, близкое к контролю. На рис. 4 представлено изменение оптиче-

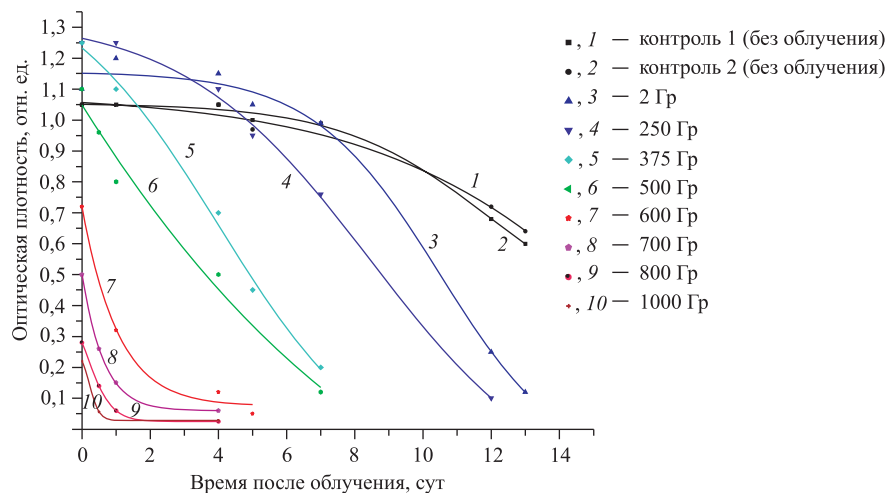


Рис. 4. Зависимость оптической плотности суспензии от времени после воздействия γ -излучения (в диапазоне доз от 2 до 1000 Гр) и в контрольной суспензии без облучения

ской плотности облученных образцов и контроля в течение длительного времени после приготовления суспензии без воздействия импульсного электрического поля. Из этих зависимостей следует, что образцы, получившие дозы до величины ~ 350 Гр, вели себя в течение нескольких суток практически как контроль. Образцы, получившие дозы порядка 350–500 Гр, в течение многих часов после облучения также трудно было отличить от контроля и тем более дифференцировать по величине поглощенной дозы. И только начиная с доз ~ 550 Гр происходили явные повреждения мембран эритроцитов, приводящие через несколько часов после облучения или сразу к гемолизу без электропорации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по характеру в зависимости относительной константы скорости гемолиза эритроцитов от поглощенной дозы γ -излучения можно сделать вывод о том, что существует некоторый диапазон, в котором степень повреждения мембран является малой и практически не зависит от дозы (фаза плато), и диапазон, где степень дефектов мембран после облучения растет с ростом поглощенной дозы. Эти результаты хорошо согласуются с опытами, проведенными на других биологических объектах и указывающими на немонотонный характер зависимости биологического эффекта облучения от величины дозы облучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудряшов Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / Под ред. В. К. Мазурика, М. Ф. Ломанова. — М.: Физматлит, 2004. 448 с.
2. Myers D. K. Some Aspects of Radiation Effects on Cell Membranes // Adv. Biol. Med. Phys. 1970. V. 13. P. 219–234.

3. Purohit S. C., Bisby R. H., Cundall R. B. Chemical Damage in Gamma-Irradiated Human Erythrocyte Membranes // Intern. J. Radiat. Biol. 1980. V. 38. P. 159–166.
4. Козлова Е. К. и др. Особенности комбинированного действия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля на биологические клетки // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2004. № 5–6. С. 65–74.
5. Козлова Е. К. и др. Исследование воздействия гамма-излучения на эритроциты с помощью электропорации // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрономия. 2005. № 3. С. 19–22.
6. Puchala M., Szweda-Lewandowska Z., Kiefer J. The Influence of Radiation Quality on Radiation-Induced Hemolysis and Hemoglobin Oxidation of Human Erythrocytes // J. Radiat. Res. 2004. V. 45. P. 275–279.
7. Antonov V. F. et al. Electrical Capacitance of Lipid Bilayer Membrane of Hydrogenated Egg Lecithin at the Temperature Phase Transition // Eur. Biophys. J. 2003. V. 32. P. 55–59.
8. Выиенская Т. В., Пасечник В. И. Проводимость и структурные переходы бислойных липидных мембран // Биофизика. 1986. Т. 31, вып. 1. С. 43–47.
9. Козлова Е. К. и др. Влияние формы электрического импульса на электропорацию мембран эритроцитов // Общая реаниматология. 2005. Т. 1, № 1. С. 42–46.

Получено 16 февраля 2007 г.