

**Summary.** The rats was irradiation at doses 1,5; 4,0; 7,0 and 10,0 Gr. After 1, 8, 15, 22 and 30 days in thymocytes was determine binding 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate, viscosity lipids and constant Shlern—Folmer for proteins by plasma membranes. Was place, that for process postradiation changes of thymocytes characteristic phase periodical structural changes plasma membranes.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров Р. В., Зарецкая Ю. М. Радиационная иммунология и трансплантация.— М.: Атомиздат, 1970.— 554 с.
2. Ярилин А. А. Клеточные основы действия радиации на иммунитет // Современ. пробл. радиобиологии.— М., 1980.— С. 86—98.
3. Петров Р. В. Иммунология острого лучевого поражения.— М.: Медицина, 1962.— 240 с.
4. Романцев Е. Ф. Радиационная биохимия тимуса.— М.: Атомиздат, 1972.— 170 с.
5. Поливода Б. И., Конев В. В., Попов Г. А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран.— М.: Энергоатомиздат, 1990.— 160 с.
6. Кагава Я. Биомембраны.— М.: Высш. шк., 1985.— 303 с.
7. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов.— М.: Наука, 1989.— 270 с.
8. Agüero R. M., Pico G., Guibert E., Corehs J. L. Interaction of the organic anion 1-aniline-8-naphthalene sulfonate (ANS) with isolated rat hepatocytes // Comp. Biochem. Physiol.— 1987.— 86B, N 1.— P. 7—10.
9. Лигонин И. С., Образцов В. В. Изучение вязкости свободных и связанных с белками липидов в мембранах // Биофизика.— 1982.— 27, № 1.— С. 81—85.
10. Ликович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
11. Зикс Л. Статистическое оценивание.— М.: Статистика, 1976.— 598 с.
12. Сунсуров А. Ю. Радиационная биология клеточной поверхности // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1988.— 178 с.— (Сер. Радиц. биология; Т. 7).
13. Фоменко Б. С., Акоев И. Г. Структурные изменения плазматических мембран под действием ионизирующей радиации // Успехи современ. биологии.— 1982.— 93, № 2.— С. 183—193.
14. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков.— Киев: Наук. думка, 1988.— 227 с.
15. Александров В. Я. Реактивность клетки и белки.— Л.: Наука, 1985.— 318 с.
16. Стрелин Г. С., Ярмоненко С. П. Процессы восстановления в облученном организме // Пострадиаци. репарация / Под ред. В. П. Парибко.— М.: Атомиздат, 1970.— С. 264—335.

Харьков. гос. ун-т

Получено 15.04.92

УДК 577.37

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

### **ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ СПОСОБНОСТЬ СВЯЗЫВАТЬ 1,8-АНИЛИНОНАФТАЛИНСУЛЬФОНАТ**

*Исследовано действие ультразвука на электрокинетические свойства тимоцитов крысы. Установлено, что озвучивание сопровождается уменьшением электрофоретической подвижности клеток. Предполагается, что наблюдаемый эффект обусловлен изменением распределения заряженных групп на клеточной поверхности.*

**Введение.** Одним из важных аспектов влияния ультразвука на биологические структуры является модификация физико-химических свойств клеточных мембран [1—3]. К настоящему времени выявлены основные закономерности действия ультразвуковых волн на структурно-функциональное состояние биомембран. Показано, что ультразвук может изменять ионную проводимость липидного бислоя [4, 5], пространствен-

© В. Д. Крушин, С. А. Курилко, В. Н. Ткаченко, Г. П. Горбенко, В. В. Товстяк, 1993

ную организацию белкового и липидного компонентов мембран [6—8], активность мембраносвязанных ферментов [9—11]. Вместе с тем, малоизученным остается вопрос о механизмах изменений электрокинетических характеристик клеточной поверхности при воздействии ультразвуковых волн [12]. Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния ультразвука на поверхностные свойства лимфоцитов методами электрофореза и флуоресцентных зондов.

**Материалы и методы.** Лимфоциты выделяли из тимуса белых крыс по методу [13] и суспендировали в среде Хенкса. Конечная концентрация клеток составляла  $1 \cdot 10^7$  мл<sup>-1</sup>.

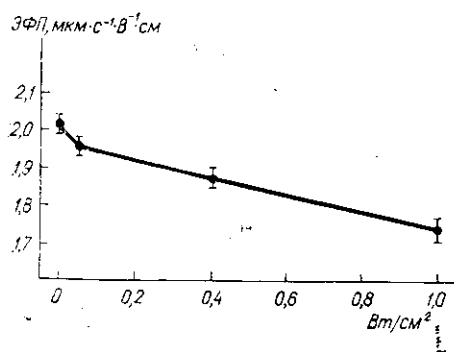


Рис. 1. Изменение ЭФП тимоцитов в зависимости от интенсивности ультразвука. Время озвучивания 60 мин

Клеточную суспензию озвучивали на частоте 880 кГц в непрерывном режиме при интенсивностях ультразвука 0,05; 0,4 и 1 Вт/см² с помощью ультразвукового терапевтического аппарата УЗТ-1. ОЗУ.

Электрофоретическую подвижность клеток (ЭФП) измеряли в прямоугольной камере с боковой ориентацией в слое Смолуховского при температуре 37 °С [16].

Флуоресценцию 1,8-анилинонафталинсульфоната (АНС) регистрировали на флюориметрической установке, созданной на базе люминесцентного микроскопа «ЛЮАМ-ИЗ». Флуоресценцию АНС возбуждали через фильтр УФС-6-5 и определяли ее интенсивность при помощи интерференционного фильтра с максимумом пропускания при длине волны 478 нм.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлены зависимости ЭФП тимоцитов от интенсивности озвучивания клеточной суспензии. При воздействии ультразвуковых волн наблюдалось снижение ЭФП клеток. Согласно современным представлениям, электрокинетические свойства клеток определяются числом нескомпенсированных зарядов в плоскости скольжения, разделяющей неподвижную и диффузную области двойного электрического слоя (ДЭС) [16]. Клеточная поверхность рассматривается как пространственная структура с гетерогенно распределенными фиксированными зарядами, которые нейтрализуются противоионами ДЭС. Количество нескомпенсированных зарядов в плоскости скольжения зависит от плотности заряженных групп на поверхности липидного бислоя, объемной плотности зарядов в гликокаликсе, а также от концентрации ионов в примембранных слоях [16, 19].

Таким образом, различия в ЭФП клеток в результате тех или иных внешних воздействий могут определяться рядом факторов: изменением плотности зарядов на поверхности липид-белкового матрикса клеточной мембраны; модификацией структурного состояния гликокаликса, сопровождающейся перемещением заряженных групп гликопротеинов и изменением объемной плотности зарядов; нарушением транспорта ионов через клеточную поверхность. Сложность и многообразие процессов, которые могут обуславливать отличия в электрокинетических свойствах клеток, не позволяют однозначно интерпретировать наблюдаемое снижение ЭФП тимоцитов под влиянием ультразвука. В настоящее время биологическое действие ультразвука рассматривается в трех основных аспектах [1]: а) тепловой эффект; б) кавитация; в) непосредственное влияние ультразвуковых волн на биоструктуры. При используемых в данной работе условиях озвучивания температура клеточной суспензии практически не менялась. Наряду с этим нельзя полностью исключить возможности возникновения механических и хими-

ческих явлений, обусловленных кавитацией. Косвенным свидетельством незначительного вклада кавитационных процессов в реализацию наблюдаемого эффекта может служить снижение ЭФП тимоцитов при низкой интенсивности ультразвука ( $0,05 \text{ Вт/см}^2$ ), когда кавитации не возникает [8].

Модифицирующее влияние некавитационного ультразвука на клетки может быть связано с образованием микропотоков жидкости у границы раздела фаз [1—4]. Установлено, что возникновение акустических

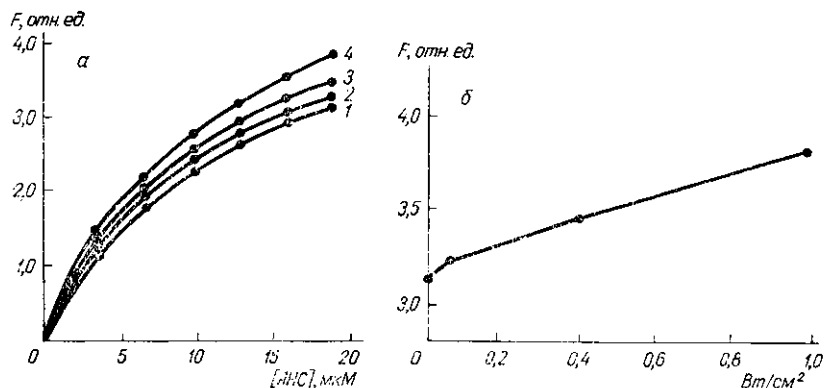


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции АНС в суспензии тимоцитов под действием ультразвука (а: 1—контроль; 2— $0,05$ ; 3— $0,4$ ; 4— $1,0 \text{ Вт/см}^2$ ) и концентрация АНС (б,  $19 \text{ мкМ}$ );  $F$  — интенсивность флуоресценции АНС

микропотоков приводит к сдвиговым деформациям мембранных структур, вызывающим изменения пространственной организации молекулярных компонентов мембран [1, 6]. Можно предположить, что одной из причин снижения ЭФП тимоцитов под действием ультразвуковых волн является структурная реорганизация полисахаридных цепей гликопротеинов, сопровождающаяся модификацией плотности фиксированных зарядов в объеме гликокаликса и сдвигами вкладов отдельных заряженных групп в величину электрокинетического потенциала [19].

С другой стороны, возможно, что в озвученных клетках изменяется плотность зарядов на поверхности липидного матрикса мембран.

Одним из широко используемых критериев модификации заряда липидного бислоя является изменение флуоресценции АНС [14]. Как видно из представленных на рис. 2 данных, озвучивание тимоцитов приводит к возрастанию флуоресценции зонда. Известно, что взаимодействие АНС с клетками определяется как поверхностным, так и трансмембранным потенциалом [14]. Однако было показано, что в суспензии тимоцитов крысы около  $84\%$  клеток имеют высокий трансмембранный потенциал, препятствующий проникновению отрицательно заряженного АНС во внутриклеточное пространство [17]. Поэтому наблюдаемый рост флуоресценции АНС можно объяснить усилением связывания зонда с внешней поверхностью мембран. В свою очередь, возрастание количества связанного зонда может быть следствием снижения плотности отрицательных зарядов на поверхности липидного бислоя [18].

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что уменьшение электрокинетического потенциала тимоцитов при воздействии ультразвука обусловлено структурной перестройкой клеточной мембраны, сопровождающейся снижением количества отрицательно заряженных групп на поверхности липид-белкового матрикса.

**Summary.** The influence of ultrasound on the electrokinetic properties of rat thymocytes has been studied. The sonication was found to decrease the electrophoretic mobility of the cells. It was suggested that the effect observed causes by the charge redistribution in the cell coat.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эльпинер М. С. Биофизика ультразвука.— М.: Наука, 1973.— 384 с.
2. Kober L., Ellwart J., Brettel A. Effect of the pulse length of ultrasound on the cell membrane damage *in vitro* // J. Acoust. Soc. Amer.— 1989.— 86, N 1.— P. 6—7.
3. Dinno M., Dyson M., Hart J. et al. The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound // Phys. Med. Ultrasound: Proc. meet.— York, 1989.— P. 10—12.
4. Товстяк В. В., Гирнык С. А. Действие ультразвука на бислойные липидные мембраны / Харьков. гос. ун-т.— Харьков, 1987.— Деп. в УкрНИИТИ 13.01.87, № 351-4к 87.
5. Теплова В. В., Холмухамедов Э. Л., Пашовкин Т. А. Влияние ультразвука терапевтических мощностей на колебания ионных потоков в эритроцитах / Ин-т биол. физики АН СССР.— Пушкино, 1989.— 20 с. Деп. в ВИНТИ 26.05.89, № 3493—В89.
6. Селиванов В. А., Зинченко В. П., Сарвазян А. Т. О механизме действия ультразвука низких интенсивностей на митохондрии // Биофизика.— 1982.— 27, № 4.— С. 653—656.
7. Древаль В. И., Залюбовский И. И., Назаренко Н. Д., Товстяк В. В. Влияние ультразвука на структуру микросомальных мембран // Докл. АН УССР.— 1985.— № 12.— С. 51—54.
8. Нирузян Л. А., Маев Р. Г., Нисневич М. М. и др. Исследование действия ультразвука на антигенную активность эритроцитов человека // Биофизика.— 1986.— 31, № 2.— С. 269—273.
9. Древаль В. И., Назаренко Н. Д., Товстяк В. В. Влияние ультразвука на АТФазную активность микросом мозга // Там же.— № 4.— С. 718—720.
10. Brugin'skaya F. I., Zorina O. M. Comparative study on therapeutic ultrasound effects on erythrocyte membrane bound and free acetylcholinesterase // Radiat. and Environ. Biophys.— 1987.— 26, N 3.— P. 239—249.
11. Chetverikova E. P., Pashovkin T. N., Rosanova N. A. et al. Interaction of therapeutic ultrasound with purified enzymes *in vitro* // Ultrasonics.— 1985.— 23, N 4.— P. 183—188.
12. Эльпинер М. Е., Дворкин Г. А. Влияние ультразвуковых волн на электрокинетический потенциал клеток // Биофизика.— 1958.— 3, № 6.— С. 641—647.
13. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клауса.— М.: Мир, 1990.— 395 с.
14. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.— М.: Наука, 1980.— 320 с.
15. Добрецов Г. Е., Косников В. В., Шанин С. С. и др. Различия между лимфоцитами, выявляемые мембранными флуоресцентными зондами // Цитология.— 1980.— 22, № 3.— С. 320—325.
16. Мирошников А. М., Фомченко В. М., Иванов А. Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток.— М.: Наука, 1986.— 184 с.
17. Косников В. В., Добрецов Г. Е. Обнаружение различий трансмембранного потенциала единичных лимфоцитов // Биол. мембраны.— 1986.— 3, № 4.— С. 391—396.
18. Черный В. В., Козлов М. М., Соколов В. С. и др. Адсорбция 1-анилин-8-нафтален-сульфоната на бислойных липидных мембранах // Биофизика.— 1982.— 27, № 5.— С. 812—817.
19. Ebeling W., Feudel M. Electric potential and charge distribution in the cell surface coat // Stud. biophys.— 1982.— 89, N 3.— P. 179—185.

Харьков гос. ун-т

Получено 11.05.92