



УДК 577.391

© 2007

В. В. Жирнов, В. М. Войцицкий, С. В. Хижняк, Е. А. Лапоша,
А. С. Казимиров

Физические свойства мембран эритроцитов в поле ионизирующей радиации малой мощности

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины В. П. Кухарем)

Experimental results obtained with fluorescent probes testifying to a modification of the structural state and a change of the surface properties of erythrocyte membranes depending on the ionizing radiation dose rate (1–100 μGy) are represented. The influence of ionizing radiation on the signal transduction is most likely realized through macromolecular structural rearrangements of the membranes.

β -Излучение в микрогреевом диапазоне доз стимулирует хемокинез нейтрофилов и дозозависимо угнетает розеткообразование лимфоцитов с эритроцитами [1]. Действие этих доз (мощностей доз) ионизирующей радиации (ИР) опосредовалось мембранными сигнальными системами клетки. Причем эти эффекты не сопровождалось развитием оксидативного стресса. Кроме того, оказалось, что изменения клеточной активности, вызванные этими дозами ионизирующей радиации, приводят к изменению поверхностного потенциала клеток крови [2]. В основе молекулярных механизмов такого действия ионизирующей радиации могут лежать конформационные изменения структурных компонентов плазматических мембран, осуществляющих сигнальную трансдукцию и формирующих поверхностный заряд.

В данной работе исследованы физические свойства плазматической мембраны эритроцитов человека при действии сверхмалых доз ионизирующей радиации (10^{-6} – 10^{-4} Гр) с помощью флуоресцентных зондов.

Материалы и методы. В исследованиях использовали плазматические мембраны, которые выделяли из эритроцитов крови доноров, согласно [3]. Содержание белка определяли методом Лоури и соавторов [4]. Облучение суспензии плазматических мембран эритроцитов осуществляли внесением в среду, содержащую 0,1 мг/мл белка, радиоактивного изотопа ^{14}C -лейцина (“Amersham”, США). Время инкубации мембранных препаратов с радиоактивным веществом составляло один час при 25 °С. Поглощенные дозы излучения, принимая его полное поглощение суспензией мембран, в зависимости от концентрации (мощности дозы)

^{14}C -лейцина ($1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ Ки/л) были рассчитаны, согласно [5], и составляли $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ Гр. Предварительные исследования, проведенные с соответствующими дозами нерадиоактивного лейцина, не показали какого-либо его влияния на исследуемые параметры.

Физические свойства плазматических мембран изучали с использованием флуоресцентного зонда АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат) и пирена производства "Sigma" (США). Интенсивность флуоресценции АНС регистрировали при $\lambda_{\text{вз}} = 370$ и $\lambda_{\text{фл}} = 470$ нм. Интенсивности триптофановой флуоресценции мембранных препаратов регистрировали при $\lambda_{\text{фл}} = 338$ нм и $\lambda_{\text{воз}} = 296$ нм.

Параметры связывания зонда с мембранными препаратами определяли, согласно [6, 7], при этом концентрация зонда в суспензии мембран варьировала с учетом определения константы связывания ($K_{\text{АНС}}$) или количества мест связывания ($N_{\text{АНС}}$).

Изменение поверхностного потенциала мембран определяли, согласно [8]. Индуктивно-резонансный перенос энергии в парах флуорофоров триптофанил — АНС (содержание белка 0,1 мг/мл, концентрация зонда 10–50 ммоль/л) и пирен — АНС (концентрация зондов 1 и 10–100 ммоль/л соответственно) оценивали, согласно [9].

Все флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре Shimadzu-RF 510 (Япония) в кварцевых односантиметровых кюветах при 25 °С. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами и представлены как среднее значение (M) \pm среднеквадратичная ошибка (m); n — объем выборки.

Известно, что при взаимодействии с биологической мембраной отрицательно заряженная молекула АНС локализуется преимущественно на поверхностных участках мембраны в зонах контакта белок — липид [6, 10]. Показано, что инкубация мембран эритроцитов в присутствии радиоактивного изотопа приводит к снижению интенсивности флуоресценции мембраносвязанного АНС. Достоверное отличие интенсивности флуоресценции АНС наблюдается для мембран, облученных дозой мощностью $1 \cdot 10^{-5}$ Гр/ч и составляет в среднем 8% относительно контроля (табл. 1).

Связывание отрицательно заряженного зонда АНС с мембраной характеризуется $K_{\text{АНС}}$ с центрами сорбции и количеством этих центров связывания. $N_{\text{АНС}}$ свидетельствует о максимальной концентрации зонда в мембране во время ее насыщения зондом, а величина $K_{\text{АНС}}$ отображает изменение свободной энергии при переходе зонда из воды в мембрану. В условиях нашего эксперимента $N_{\text{АНС}}$ уменьшается, при этом снижение $K_{\text{АНС}}$ может происходить вследствие изменения сродства определенных участков эритроцитарной мембраны к АНС. Наибольшие изменения наблюдаются при действии β -излучения мощностью $1 \cdot 10^{-5}$ Гр/ч: $K_{\text{АНС}}$ уменьшается на 23% относительно контроля, а $N_{\text{АНС}}$ на 27% соответственно.

Таблица 1. Спектральные характеристики АНС, связанного с мембранами эритроцитов, при действии β -излучения ($M \pm m$, $v = 10-15$)

Показатель	Контроль	Мощность дозы (поглощенная доза) β -излучения		
		$1 \cdot 10^{-6}$ Гр/ч ($1 \cdot 10^{-6}$ Гр)	$1 \cdot 10^{-5}$ Гр/ч ($1 \cdot 10^{-5}$ Гр)	$1 \cdot 10^{-4}$ Гр/ч ($1 \cdot 10^{-4}$ Гр)
$I_{\text{флуоресц.}}$, отн. ед.	$1,0 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,03$	$(0,92 \pm 0,03)^*$	$0,95 \pm 0,03$
$K_{\text{АНС}}$, 10^4 M^{-1}	$3,80 \pm 0,35$	$3,63 \pm 0,47$	$(2,94 \pm 0,40)^*$	$3,50 \pm 0,45$
$N_{\text{АНС}}$, нмоль/мг белка	$4,79 \pm 0,40$	$4,50 \pm 0,50$	$(3,52 \pm 0,40)^*$	$4,26 \pm 0,42$
$\Delta\phi$, мВ	—	$1,01 \pm 0,04$	$2,21 \pm 0,04$	$1,25 \pm 0,03$

*Наличие достоверного отличия от контроля; $p < 0,05$.

Следует учитывать, что интенсивность флуоресценции АНС зависит от структуры и конформации центров связывания, а гетерогенность мембранной поверхности обуславливает существование центров сорбции АНС разных типов [11]. Причем показано существование не только разных центров связывания АНС в мембране, но и разных конформаций зонда, которые характеризуются отличными параметрами флуоресценции [7]. Поскольку АНС несет единичный отрицательный заряд, то изменения поверхностного заряда мембраны могут влиять на флуоресценцию зонда и параметры его связывания с мембраной [6]. Исходя из рекомендаций, приведенных в работе [8], определили изменение поверхностного потенциала мембраны относительно контроля в условиях опыта. Наибольшее изменение наблюдается при облучении дозой мощностью $1 \cdot 10^{-5}$ Гр/ч (см. табл. 1). Поверхностный потенциал мембраны является функцией плотности электрического заряда на поверхности мембраны. Увеличение поверхностной плотности заряда приводит к увеличению поверхностного потенциала. В свою очередь это приводит к росту электростатической отталкивающей силы между АНС и мембраной в участках связывания АНС и уменьшению флуоресценции системы АНС — мембрана. Заряженные группы в мембране могут появляться в результате протекания процессов ПОЛ. При этом топографическое перераспределение отрицательно заряженных компонентов свидетельствует о конформационных перестройках мембраны.

Таким образом, данные, полученные с использованием АНС, свидетельствуют об изменениях поверхностных свойств мембраны эритроцитов при действии β -излучения в диапазоне поглощенных доз $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ Гр. Причем, наибольшие изменения наблюдаются при мощности дозы $1 \cdot 10^{-5}$ Гр/ч. В свою очередь структурная модификация мембраны приводит к снижению количества центров связывания АНС и изменению их свойств.

Структурное состояние мембран эритроцитов в поле облучения оценивали также по эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии (ИРПЕ) в парах флуорофоров: триптофанил — АНС и пирен — АНС, которые локализуются в разных участках мембраны. При анализе результатов исследований учитывали, что триптофаловые остатки локализуются преимущественно в гидрофобных участках белков, АНС — на границе распределения липид — вода, а пирен — в зоне жирнокислотных цепей фосфолипидов [7].

Результаты исследования эффективности безизлучательного переноса энергии от триптофаниловых групп на АНС свидетельствуют о достоверном снижении показателя $F_0/(F_0 - F)$ на 14% относительно контроля при поглощенной дозе $1 \cdot 10^{-6}$ Гр (табл. 2). Выявленные изменения указывают на увеличение эффективности ИРПЕ в паре триптофанил — АНС, за счет сокращения расстояния между остатками триптофана и участками связывания АНС.

Результаты исследований эффективности ИРПЕ в паре пирен — АНС свидетельствуют, что при действии β -излучения мощностью $1 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ Гр/ч показатель $F_0/(F_0 - F)$

Таблица 2. Эффективность индуктивно-резонансного переноса энергии ($F_0/(F_0 - F)$) в парах триптофанил — АНС и пирен — АНС для мембран эритроцитов при действии β -излучения ($M \pm m$, $v = 10-15$)

Показатель	Контроль	Мощность дозы (поглощенная доза) β -излучения		
		$1 \cdot 10^{-6}$ Гр/ч ($1 \cdot 10^{-6}$ Гр)	$1 \cdot 10^{-5}$ Гр/ч ($1 \cdot 10^{-5}$ Гр)	$1 \cdot 10^{-4}$ Гр/ч ($1 \cdot 10^{-4}$ Гр)
$\frac{F_0}{F_0 - F}$ (триптофанил — АНС)	$3,48 \pm 0,07$	$(3,00 \pm 0,09)^*$	$3,32 \pm 0,10$	$3,59 \pm 0,05$
$\frac{F_0}{F_0 - F}$ (пирен — АНС)	$3,11 \pm 0,03$	$(2,21 \pm 0,11)^*$	$(2,03 \pm 0,22)^*$	$(3,30 \pm 0,05)^*$

*Наличие достоверного отличия от контроля; $p < 0,05$.

снижается соответственно на 29 и 35%. При облучении дозой мощностью $1 \cdot 10^{-4}$ Гр/ч наблюдается противоположный эффект, т. е. этот показатель достоверно увеличивается на 6% относительно контроля (см. табл. 2).

Эффективность ИРПЕ в каждой паре в значительной степени зависит от взаимного расположения участков преимущественной локализации флуорофоров, что дает возможность оценить изменения пространственной организации мембраны [9]. Изменения эффективности ИРПЕ в паре триптофанил — АНС указывает на поверхностную модификацию мембранной структуры. Изменения эффективности ИРПЕ в паре пирен — АНС свидетельствует об изменениях эффективной толщины липидной компоненты мембраны, поскольку критическое расстояние переноса энергии в соответствующей паре флуорофоров равно 2,8 нм [6]. То есть выявленное снижение эффективности ИРПЕ в мембранах эритроцитов при облучении в дозах $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ Гр указывает на уменьшение расстояния между зондами и соответственно эффективной толщины гидрофобного участка мембран.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о структурной модификации мембран эритроцитов и изменении физических свойств поверхностных участков в условиях действия сверхмалых доз ионизирующей радиации. Это указывает на то, что ранее обнаруженное нами влияние β -излучения на поверхностный заряд плазматической мембраны клеток и функциональное состояние ее сигнальных компонентов, скорее всего, реализуется через макромолекулярные структурные перестройки плазматической мембраны.

1. Zhirnov V. V., Luik A. I., Metelitsa L. A. et al. Effect of small doses of ionizing radiation on motility, rosette formation, and antioxidant state of leukocytes under modification of G-protein by cholera and pertussis toxins // Доп. НАН України. – 2000. – No 10. – С. 172–176.
2. Журнов В. В., Гавий В. Н., Казимиров А. С. Влияние β -излучения низкой мощности на поверхностный потенциал клеток крови человека *in vitro* // Там само. – 2003. – № 11. – С. 157–161.
3. Транспортные аденозинтрифосфатазы. Современные методы исследования / Под. ред. А. А. Болдырева. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1977. – 195 с.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, No 1. – P. 265–275.
5. Loevinger R., Budinger T. F., Watson E. E. MIRD primer for absorbed dose calculations. – New York: Soc. Nuclear Medicine, 1991. – 4 p.
6. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – Москва: Наука, 1980. – 320 с.
7. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. – Москва: Наука, 1989. – 277 с.
8. Древаль В. И. Изменение липидного компонента плазматических мембран тимоцитов при воздействии ионизирующего излучения // Радиобиология. – 1993. – **33**, № 1. – С. 45–48.
9. Фоменко Б. С., Длмбетова Г. К., Ажоев И. Г. Индуктивно-резонансный перенос энергии между хромофорами, локализованными в разных участках облученных и необлученных теней эритроцитов // Там же. – 1985. – **25**, № 1. – С. 12–15.
10. Формазюк В. Е., Осис Ю. Г., Деев А. и др. Изменение белок-липидных взаимодействий при перекисном окислении липопротеинов сыворотки крови // Докл. АН СССР. – 1982. – **263**, № 2. – С. 497–500.
11. Бойцов В. М., Орлов С. Н. Применение анализа спектров флуоресценции зондов для исследования структурного состояния сорбента, гетерогенные участки связывания // Биофизика. – 1982. – **27**, вып. 6. – С. 1049–1052.

Институт биоорганической химии
и нефтехимии НАН Украины, Киев
Киевский национальный университет
им. Тараса Шевченко
Научно-производственное предприятие
“Атомкомплексприбор”, Киев

Поступило в редакцию 23.11.2006