

БИОЛОГИЯ

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2011 г.

В.А. Калинин, О.В. Орлова, О.А. Деулина, В.Н. Крылов

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

kbf@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 25.03.2011

Показано, что действие малыми дозами ионизирующей радиации (от 0.04 до 0.33 мГр) на цельную кровь человека приводит к нелинейным изменениям гемолиза эритроцитов, вызванным гипо- и гиперосмотическим воздействием: первоначальное усиление гемолиза сменяется частичным восстановлением и стабилизацией осмотической резистентности эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, малые дозы радиации, осмотическая резистентность.

Введение

Исследование влияния малых доз ионизирующей радиации на структурно-функциональное состояние мембраны является актуальным для понимания молекулярных механизмов радиационного повреждения и возникающей устойчивости клеток к действию данного фактора [1, 2]. Однако большинство работ в этом направлении выполнено с применением хронического или длительного облучения [2], когда регистрируются интегральные и отдаленные последствия радиации, что затрудняет выявление переходных механизмов деструктивных и защитных процессов. В последнее время высказана новая концепция механизма поражения клеток повреждающими факторами внешней среды, согласно которой система осмотического гомеостаза является одной из критических мишеней радиационного, ультразвукового, кислотного и теплового поражения клеток [3]. В связи с указанным, в работе изучали осмотическую резистентность эритроцитов крови человека в динамике однократного кратковременного (40 минут) облучения малыми дозами низкоинтенсивной радиации (НИР).

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлась цельная консервированная кровь человека. Для облучения кровь помещали в чашку Петри диаметром 3 см. На расстоянии 1 см от поверхности суспензии находился стандартный β -источник ионизирующей радиации ^{90}Sr - ^{90}Y с активностью

$9 \cdot 10^4$ Бк. Рассчитанная мощность дозы при этом составляла около 0.5 мГр/ч. Кровь подвергали облучению в течение 40 минут с ее анализом на этапах облучения через 5, 10, 20, 30 и 40 минут (соответствующие расчетные дозы при этом составляли 0.04; 0.08; 0.16; 0.25 и 0.33 мГр). На каждом этапе облучения из общего объема отбирали часть крови и проводили анализ осмотической резистентности эритроцитов. Контролем служила необлученная кровь, которую анализировали также по этапам. Необлученную и облученную кровь центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин. Супернатант сливали. К осадку добавляли 2–3-кратный объем изотонической среды, содержащей 145 мМ NaCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ Трис-HCl pH 7.4. После перемешивания вновь центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин.

Осмотическую резистентность эритроцитов оценивали по степени их устойчивости к действию гипо- или гиперосмотического раствора инкубационной среды. В случае гипертонического воздействия к полученному осадку эритроцитов добавляли раствор среды, содержащей 1.5 М NaCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ Трис-HCl pH 7.4 [4], гипотонического – среду, содержащую 67 мМ NaCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ Трис-HCl pH 7.4 [5]. Инкубацию проводили в течение 10 мин при комнатной температуре. После инкубации полученную суспензию центрифугировали 5 мин при скорости 3000 об/мин для отделения осадка эритроцитов от надосадочной жидкости, содержащей гемоглобин. Количество вышедшего гемоглобина оценивали методом фотоколориметрии измерением оптической плотности

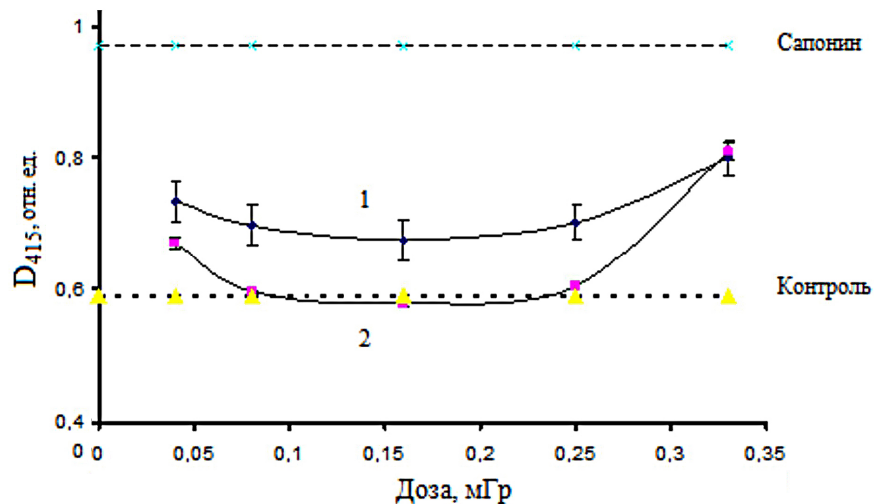


Рис. 1. Динамика изменения оптической плотности (D_{415}) надосадочной жидкости, характеризующей количество вышедшего гемоглобина из эритроцитов крови, подвергнутой облучению разными дозами низкоинтенсивной радиации и последующему гипо- (кривая 1) или гиперосмотическому (кривая 2) воздействию

(ОП, D , отн. ед.) надосадочной жидкости при длине волны $\lambda = 415$ нм (D_{415}) [6].

Осажденные эритроциты вновь инкубировали в изотонической среде в течение 10 минут, после чего оценивали величину лизиса эритроцитов. Последнюю манипуляцию проводили в связи с тем, что гибель клеток при гиперосмотической дегидратации, как правило, происходит не при дегидратации, а при попытке вернуть их в нормальные изотонические условия, т.е. при регидратации [4]. Можно предположить, что и при гипоосмотической дегидратации возможны те же процессы, т.е. максимальный гемолиз будет наблюдаться при возвращении эритроцитов в исходную изотоническую среду. Величину гемолиза оценивали как величину интегрального светорассеивания эритроцитарной суспензии, которую определяли как оптическую плотность суспензии при длине волны $\lambda = 720$ нм (D_{720}) [4, 5]. Аналогичным процедурам, за исключением облучения, подвергали кровь контрольных вариантов. Процент гемолиза в пробах рассчитывали по отношению к 100%-му лизису такого же количества эритроцитов, разрушенных добавлением сапонина из расчета 2 мг на 1 мл крови [7]. Результаты обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 показана динамика изменения ОП надосадочной жидкости после воздействия на облученную и необлученную кровь гипо- и гиперосмотической среды. Как видно, обе кривые, демонстрирующие выход гемоглобина из эритроцитов в динамике облучения, расположены

выше контроля (необлученная кровь) и ниже сапонина (100% выхода гемоглобина). Уже при дозе 0.04 мГр выход гемоглобина усиливается, превышая в 1.3 раза ОП показателей контроля, а в интервале от 0.08 до 0.25 мГр количество вышедшего гемоглобина уменьшается, оставаясь выше контроля при гипо- и гиперосмотическом гемолизе. При увеличении дозы до 0.33 мГр скорость выхода гемоглобина вновь усиливается, приближаясь к уровню ОП сапонинового контроля, характеризующего 100%-ную потерю гемоглобина. Таким образом, облучение разными дозами НИР приводит к нелинейным и разнонаправленным изменениям ОП, отражающим выход гемоглобина при гемолизе эритроцитов.

Аналогичная динамика была получена при измерении ОП суспензии эритроцитов после воздействия на них НИР, гипо- и гиперосмотической среды и ремоделирования в изотонической среде (рис. 2). Как видно, облучение разными дозами НИР также приводит к нелинейным и разнонаправленным изменениям ОП. При дозе облучения 0.04 мГр ОП суспензии эритроцитов, испытывавших влияние низкоосмотической среды, в 1.8 раза превосходит уровень ОП контроля и оказывается почти в 2.7 ниже такового при действии гипертонической среды. В интервале доз от 0.08 до 0.25 мГр происходит частичное восстановление и стабилизация ОП, однако остается достоверно выше и ниже контрольных при гипо- и гиперосмотическом воздействии. В дальнейшем, при повышении дозы облучения (0.33 мГр), вновь наблюдается увеличение ОП. При этом необлученные эритроциты, подвергнутые аналогичной гипо- и гипертонической нагрузке, имеют почти совпадающие и не изменяющиеся уровни ОП (0.354 ± 0.008 и

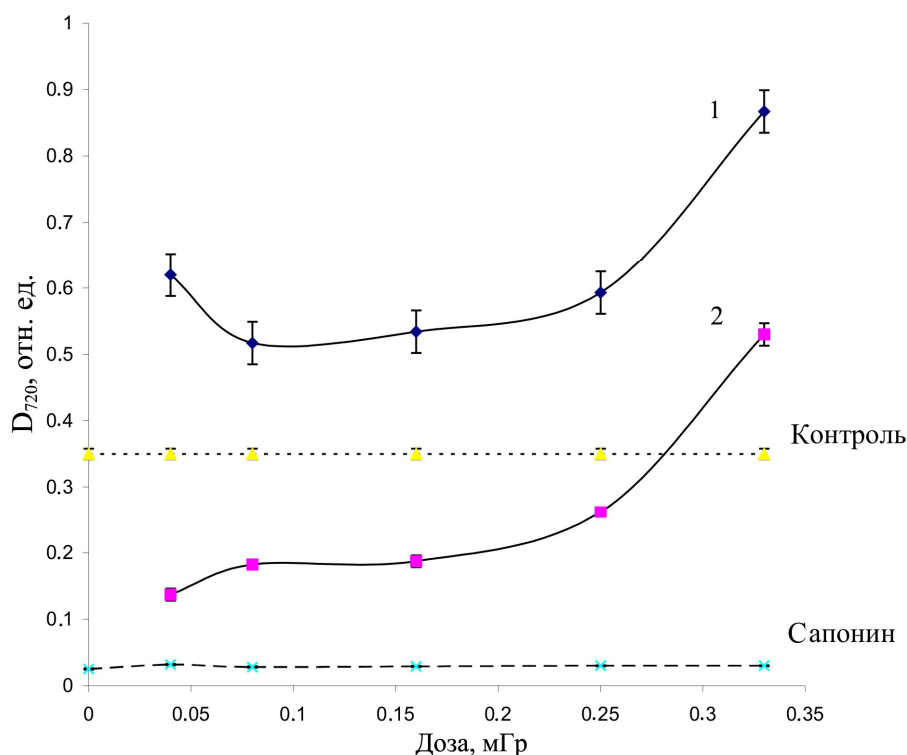


Рис. 2. Динамика изменения оптической плотности (D_{720}) суспензии эритроцитов крови, подвергнутой облучению разными дозами низкоинтенсивной радиации и последующему гипо- (кривая 1) или гиперосмотическому (кривая 2) воздействию

0.367 ± 0.006 соответственно). Варианты контроля в присутствии сапонина, вызывающего лизис эритроцитов крови [8], имеют более чем на порядок меньшую величину ОП.

Таким образом, из полученных результатов следует, что воздействие малыми дозами ионизирующей радиации (от 0.04 до 0.33 мГр) на цельную кровь человека приводит к нелинейным изменениям гемолиза эритроцитов, вызванным гипо- и гиперосмотическим воздействием: первоначальное усиление гемолиза сменяется частичным восстановлением и стабилизацией эритроцитов, с дальнейшим нарастанием гемолиза по мере увеличения дозы облучения.

Нелинейные колебания радиоиндуцируемых эффектов являются характерными для действия малых доз радиации на биообъекты — с их усилением на начальных этапах и снижением с увеличением дозы, как полагают, связанных с запуском компенсаторных механизмов [9]. Можно предположить, что в условиях наших опытов включение репарационных механизмов, по-видимому, происходит в интервале доз от 0.08 до 0.16 мГр, где наблюдается частичное восстановление и временная стабилизация эритроцитов, а также замедление выхода из них гемоглобина с дальнейшим его усилением по мере нарастания дозы облучения. В пользу сказанного отметим, что при облучении крови обнаруживается сходная нелинейная динамика в

степени изменения ОП эритроцитов и ОП вышедшего из них гемоглобина. Коэффициенты корреляции соответственно равны 0.943 ($P < 0.001$) для гипотонического гемолиза и 0.683 ($P < 0.001$) для гипертонического.

Однако приведенное рассуждение соответствует только динамике выхода гемоглобина (рис. 1). Динамика же изменения процента гемолиза эритроцитов, оцениваемая по изменению ОП, сходна с динамикой изменения ОП для гемоглобина лишь в первой половине интервала доз облучения. В дальнейшем ОП для эритроцитов увеличивается, противореча величине их гемолиза. Известно, что ОП при 720 нм является величиной интегрального светорассеивания эритроцитарной суспензии, пропорциональной числу неразрушенных клеток [5]. Поэтому полученные результаты можно объяснить только при условии, если, несмотря на уменьшение в результате гемолиза количества целых эритроцитов, оставшиеся увеличивают свой объем, что приводит к резкому повышению ОП на последних этапах опыта. Из литературы известно, что перед гемолизом (предгемолитическое состояние) эритроцит превращается в сфероцит с увеличением объема в 1.6 раз [10]. Далее происходит образование пор в мембране с дозированным выходом наружу гемоглобина — медленный и потом быстрый гемолиз [11, 12]. Возможно, именно этот момент — предгемолитического

состояния эритроцитов и, соответственно, увеличение ОП – и был зарегистрирован в наших опытах на этапе облучения 0.33 мГр.

Кроме того, потеря гемоглобина обычно считается промежуточным этапом гемолиза, результатом чего является образование так называемых теней – замкнутых мембранных формирований [13]. Отсутствие гемоглобина приводит к резкому снижению светорассеивающих свойств теней, что, по-видимому, объясняет эффект увеличения ОП при облучении в дозе 0.33 мГр. Следует также учесть, что выявленное несовпадение кривых для гемоглобина и эритроцитов может быть обусловлено и методическим различием – количество вышедшего гемоглобина определялось сразу после гипо- и гиперосмотической нагрузки, а целостность эритроцитов определяли после ремоделирования в изотонической среде.

Таким образом, облучение малыми дозами НИР и последующая осмотическая нагрузка являются дестабилизирующими факторами, приводящими к развитию гемолитического процесса в эритроцитах. При этом начальные дозы НИР приводят к временной активации защитных механизмов и повышению осмотической резистентности мембраны. Это может быть связано с активацией антиоксидантной системы клетки вследствие усиления перекисидации липид-белкового матрикса воздействием радиации [14].

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (госконтракт № П604).

Список литературы

1. Эйдус Л.Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз. М.: ИТЭБ РАН, 2001. 81 с.
2. Рыскулова С.Т. Радиационная биология плазматических мембран. М.: Энергоатомиздат, 1986. 128 с.
3. Морозов И.И. Осмотический гомеостаз как одна из критических мишеней поражения клеток некоторыми факторами внешней среды // Радиобиология и радиэкология. 2010. Т. 50. № 5. С. 514–522.
4. Руденко С.В., Пателарос С.В. Активирующее и ингибирующее влияние двухвалентных катионов на постгипертонический лизис эритроцитов // Биологические мембраны. 1995. Т. 12. № 4. С. 374–384.
5. Заводник И.Б., Пилецкая Т.П., Степура И.И. Осмотический и механический лизис эритроцитов человека // Биологические мембраны. 1995. Т. 12. № 4. С. 400–407.
6. Черницкий Е.А., Сенькович О.А. Гемолиз эритроцитов детергентами // Биологические мембраны. 1997. Т. 14. № 4. С. 385–392.
7. Гительзон И.И., Терсков И.А. Закономерности распределения эритроцитов по стойкости к различным гемолизаторам // В сб.: Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. М.: Наука, 1961. С. 30–59.
8. Васильева И.С., Пасешниченко В.А. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность // Успехи биол. химии. 2000. Т. 40. С. 153–204.
9. Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Горбунова Н.В. Особенности биологического действия малых доз облучения // Радиационная биология. Радиэкология. 1996. Т. 36. № 4. С. 610–631.
10. Козлов М.М., Маркин В.С. Теория осмотического лизиса липидных везикул // Биологические мембраны. 1981. Т. 1. № 1. С. 74–90.
11. Бондарев Л.С., Зайцев И.А., Жидких В.Н. Влияние некоторых воздействий на осмотическую стойкость эритроцитов // Лаб. дело. 1990. № 7. С. 29–31.
12. Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. Физико-химическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. II этап гемолиза // Биофизический вестник. 1998. № 422. Вып. 2. С. 54–58.
13. Бессонова С.В., Азимов Р.Р., Сабиров Р.З. Формирование теней в постлитической стадии коллоидно-осмотического лизиса человеческих эритроцитов // Биологические мембраны. 2002. Т. 19. № 3. С. 221–227.
14. Поливода Б.И., Конев В.В., Попов Г.А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран. М.: Энергоатомиздат, 1990. 160 с.

EFFECT OF LOW DOSES OF RADIATION ON ERITHROCYTE OSMOTIC RESISTANCE

V.A. Kalinin, O.V. Orlova, O.A. Deulina, V.N. Krylov

It is shown that the effect of small doses of ionizing radiation (from 0.04 to 0.33 mGy) on human whole blood leads to nonlinear changes of erythrocyte hemolysis induced by hypo- and hyperosmotic exposure: initial enhancement of hemolysis is replaced by partial recovery and stabilization of the osmotic resistance of erythrocytes.

Keywords: erythrocytes, hemolysis, low doses of radiation, osmotic resistance.