



УДК 612.111

© 2011

В. В. Жирнов, И. Н. Яковенко, Л. В. Грубская

**Влияние сверхмалых доз β -излучения (^{90}Sr)
на осмотическую резистентность эритроцитов человека
на фоне модификации активности ионных потоков**

(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)

Досліджений вплив поля іонізуючого випромінювання малої потужності (ІВМП) на осмотичну резистентність (ОР) еритроцитів у присутності іонофору А23187 та інгібітора Ca^{2+} -залежних каналів K^+ — нітрєндипіну. Виявлено, що поле ІВМП (1,5–15,0 мкГр) викликає істотне збільшення гіпотонічного гемолізу еритроцитів. Показано, що активатор Ca^{2+} -залежних каналів K^+ , іонофор А23187 та інгібітор — нітрєндипін в однаковому діапазоні концентрацій (0,1–10 мкмоль/л) істотно збільшували ОР. Іонізуюче випромінювання (1,5 мкГр/год) підсилювало дію іонофору А23187 у вказаних концентраціях. Нітрєндипін в концентрації ≥ 1 ммоль/л відмінював дію β -випромінювання. Отримані дані свідчать, що поле ІВМП модифікує як Ca^{2+} -опосередковану, так і Ca^{2+} -незалежну клітинну сигналізацію, що регулює ОР еритроцитів.

Ранее было показано, что β -излучение (^{90}Sr и ^{14}C) в диапазоне сверхмалых доз (0,5–5,0 мкГр) изменяет электрофоретическую подвижность эритроцитов и лейкоцитов, хемотаксис нейтрофилов и розеткообразование лимфоцитов, а также эндотелийзависимую вазоконстрикцию изолированных фрагментов артерий [1–3]. Причем эти клеточные реакции обратимы, их можно зарегистрировать только в том случае, если измерения проводятся в поле β -излучения. Результаты проведенных исследований позволили установить существенное влияние наложенного поля ионизирующей радиации малой мощности (ИРММ) на сигнальную трансдукцию в изученных биологических объектах. В дальнейшем было установлено, что в поле ИРММ происходят изменения в структурной организации мембран эритроцитов человека [4], что, по-нашему мнению, является главным механизмом, лежащим в основе наблюдаемых биологических эффектов в данном поле. Реорганизация структуры мембраны в малом радиационном поле изменяет функциональные ответы клетки на действие лигандов, модулирующих активность мембранных сигнальных каскадов [1, 2], от состояния которых во многом зависят мембранно-цитоскелетная адгезия и механическая

стабильность эритроцитов [5]. Следовательно можно ожидать изменения осмотической резистентности (ОР) эритроцитов в поле ИРММ вследствие модификации мембранной структуры, вызываемой β -излучением.

Целью данной работы было изучение влияния наложенного поля ИРММ на стабильность клеточных мембран, которая оценивалась по изменению ОР эритроцитов на фоне модификации ионных потоков, вызываемых кальцимицином и нитрендипином.

Исследования проводили на эритроцитах человека, выделенных из гепаринизированной крови доноров. Клетки дважды отмывали центрифугированием в физиологическом фосфатном буфере (10 ммоль/л, pH 7,4), а затем однократно в изотоническом растворе Кребса такого состава, ммоль/л: NaCl 133; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgCl₂ 1,2; NaH₂PO₄ 1,38; NaHCO₃ 10; глюкоза 7,8; HEPES 10 (pH 7,4); осмолярность 300 мОсм/л. ОР эритроцитов определялась в растворах Кребса различной осмолярности, чтобы создать более естественное субстратное и ионное окружение, позволяющее избежать падения энергетического потенциала эритроцитов, вызываемого ионофором. Количество эритроцитов во всех пробах составляло $5 \cdot 10^6$ кл./мл. В опытные клеточные суспензии (до создания гипоосмотических условий) предварительно вносили исследуемые вещества, затем аликвоты растворов ⁹⁰Sr(NO₃)₂ (37,0, 3,7 и 0,37 кБк/л) с последующей 10-минутной инкубацией проб при комнатной температуре. Во всех клеточных суспензиях концентрация ⁹⁰Sr(NO₃)₂ не превышала 2,3 нмоль/л и такие концентрации нерадиоактивного Sr(NO₃)₂ не влияли на ОР эритроцитов. После создания необходимого конечного значения осмолярности в пробе клеточные суспензии инкубировали на шейкере при 37 °С в течение 50 мин. Пробы осаждали центрифугированием, затем измеряли в супернатанте поглощение гемоглобина при 416 нм. Осмолярность раствора, при которой наблюдался 50%-й гемолиз клеток (показатель средней ОР, Γ_{50}), рассчитывали из полученных кривых с использованием пакета математических программ Origin 6.1 ("Microsoft", США). Поглощенные клетками дозы радиационного облучения рассчитывались, как описано ранее [4]. Данные представлены в виде среднего \pm среднеквадратичная ошибка среднего значения ($M \pm m$). Статистическая оценка выполнялась с использованием *t*-критерия Стьюдента для выбранного уровня значимости $p < 0,05$.

В поле ИРММ при поглощенных дозах (1,5 и 15 мкГр) степень гемолиза эритроцитов человека дозозависимо снижалась в среднем на 24% (табл. 1). Действующие дозы радиации, как видно из рис. 1, сдвигают кривую гемолиза вправо, т. е. в сторону большей осмолярности среды. Показатель средней ОР, определяемый долей клеток с пониженной резистентностью в общем пуле эритроцитов, повышался в среднем на 9% (см. рис. 1). Как известно, Ca²⁺-зависимое повышение ОР, вызываемое кальцимицином, сопровождается выходом ионов K⁺

Таблица 1. Влияние поля ионизирующей радиации разной мощности на гипотонический лизис эритроцитов человека

Показатель, %	Контроль	Поглощенная доза, мкГр		
		0,15	1,5	15,0
Гемолиз	52,1 \pm 1,28	54,4 \pm 3,13	63,5 \pm 1,49*	65,6 \pm 3,00*
% Относительно контроля	100,0	104,4	121,9	125,9

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: клетки инкубированы в гипоосмотическом растворе Кребса ($\Gamma_{50} = 96,1$ мОсм/л). Данные приведены в процентном выражении к полному лизису клеток (100%); объемы выборок *n* везде равны 6.

* — $p < 0,05$ относительно контроля (фоновое облучение).

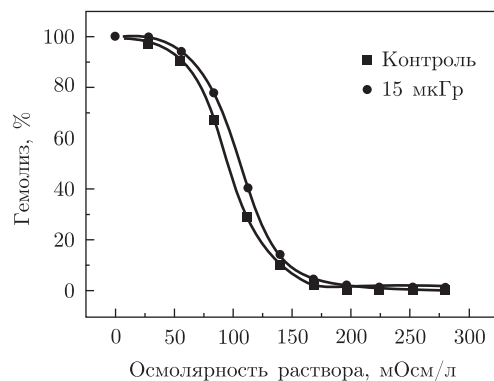


Рис. 1. Кривые гипотонического лизиса эритроцитов человека в поле ИРММ и контроле (контроль: $\Gamma_{50} (96,1 \pm 0,52)$ мОсм/л; ^{90}Sr 15 мкГр: $\Gamma_{50} = (104,8 \pm 0,38)$ мОсм/л)

и Cl^- из клетки через Ca^{2+} -активируемые каналы K^+ ($K_{\text{Ca}3,1}$) с сопутствующей потерей воды (Гардос-эффект), что ограничивает коллоидоосмотическое набухание и лизис эритроцитов. В связи с этим нами изучено влияние поля ИРММ на ОР эритроцитов в присутствии модификаторов трансмембранных токов Ca^{2+} .

В отличие от действующих доз β -излучения ионофор А23187 в диапазоне доз от 1 до 10 мкмоль/л вызывал обратный эффект, т.е. увеличивал ОР эритроцитов человека (табл. 2). В более низких концентрациях эффективность действия ионофора дозозависимо снижалась. В поле β -излучения (1,5 мкГр/ч) повышение ОР эритроцитов, вызванное кальцимицином, не только не снижалось, как можно было ожидать, но, напротив, достоверно усиливалось независимо от его концентрации в диапазоне от 0,1 до 10 мкмоль/л (см. табл. 2). В недействующей концентрации ионофор А23187 (10 нмоль/л) отменял действие β -излучения.

Дигидропиридиновые производные ингибируют в эритроцитах человека не только потенциалуправляемые кальциевые каналы L-типа, но и каналы $K_{\text{Ca}3,1}$. В связи с этим изучено влияние на ОР эритроцитов нитрендипина — одного из наиболее активных соединений среди дигидропиридиновых ингибиторов каналов $K_{\text{Ca}3,1}$ [6].

Нитрендипин в высокой концентрации (0,1 ммоль/л) снижал ОР эритроцитов на 18% (табл. 3). Напротив, в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкмоль/л этот препарат дозозависимо повышал ОР клеток в среднем на 13%. Концентрация нитрендипина 10 нмоль/л

Таблица 2. Действие кальцимицина на гипотонический лизис эритроцитов человека (в %) в растворе Кребса с осмолярностью, равной значению Γ_{50} , в контроле и на фоне облучения ^{90}Sr (1,5 мкГр/ч)

Условия опыта	Негативный контроль	Концентрация ионофора, моль/л			
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Ионофор А23187	$52,1 \pm 0,5$	$(37,8 \pm 2,5)^*$	$(37,5 \pm 2,8)^*$	$(43,5 \pm 2,4)^*$	$(41,7 \pm 3,9)^*$
% Относительно негативного контроля	100,0	$72,6 \pm 4,8$	$72,0 \pm 5,5$	$83,5 \pm 4,6$	$80,0 \pm 7,5$
Ионофор А23187 + ^{90}Sr	$49,0 \pm 2,4$	$(28,1 \pm 1,7)^*$	$(27,8 \pm 1,8)^*$	$(24,7 \pm 2,5)^*$	$46,0 \pm 2,1$
% Относительно негативного контроля	100,0	$(57,3 \pm 3,5)^{**}$	$(56,7 \pm 3,7)^{**}$	$(50,4 \pm 5,2)^{**}$	$93,9 \pm 4,3$

Примечание. Здесь и в табл. 3: поглощенная доза β -излучения составляла 1,5 мкГр; * — $p < 0,05$ относительно негативного контроля (без препарата и ^{90}Sr); ** — $p < 0,05$ относительно позитивного контроля (необлученные клетки при той же концентрации препарата).

была недействующей. В поле ионизирующей радиации антигемолитический эффект нитрендипина достоверно не изменялся во всем диапазоне концентраций.

Известно, что окислительный стресс вызывает увеличение клеточного объема эритроцитов, деградацию мембранных белков и снижение ОР эритроцитов. Однако, как указывалось выше, поле ИРММ не индуцирует окислительный стресс, но модифицирует структуру мембран эритроцитов человека, изменяя, в частности, белково-липидные взаимодействия, что сопровождается изменением процессов сигнальной трансдукции [1, 4]. Устойчивость мембран эритроцитов к гемолизу контролируется сигнальными системами клеток. В публикации показано участие в регуляции стабильности мембран эритроцитов ряда компонентов сигнальной трансдукции, в том числе β -адреноблокаторов, эйкозаноидов и G-белков [7], сигнальные эффекты которых также модулируются полем ИРММ [1–3]. Это позволяет предположить, что поле ИРММ влияет на лизис эритроцитов за счет конформационных переходов мембранных белков, вызываемых наложенным полем, сопровождающихся модуляцией клеточной сигнализации.

Ионофор А23187 в присутствии Ca^{2+} стимулирует в эритроцитах человека распад мембранных фосфолипидов, сопровождающийся модификацией цитоскелета. Ранее нами было показано, что поле ИРММ модифицирует действие лигандов α_1 -адренорецепторов, сигнальная функция которых также опосредуется распадом полифосфоинозитидов, на зависящий от структурной организации мембран дзета-потенциал клеток крови. Таким образом, наблюдаемое влияние β -излучения на лизисную активность кальцимицина может, по крайней мере, частично обуславливаться этим механизмом.

Кальцимицин вызывает существенные возмущения в структуру мембран, инициируя перекрестное связывание мембранных протеинов, катализируемое трансклутаминазой, селективную потерю гликозилинозитол-заякоренных и интегральных мембранных белков, а также увеличивает степень фосфорилирования белков зоны 3 [8]. Действие ионофора А23187 частично опосредуется Ca^{2+} -связывающим белком-кальмодулином, под контролем которого находятся спектрин, спектрин-киназа и Ca^{2+} -АТФаза эритроцитарной мембраны, от их конформационных состояний также зависит ОР эритроцитов [9]. Таким образом, можно предположить, что конформационные изменения белков в поле ИРММ, а значит, и наблюдаемые эффекты β -излучения зависят от модификации мембран, вызываемых сопутствующими агентами, чем можно объяснить разнонаправленность действия β -излучения в присутствии и отсутствии кальцимицина.

Нитрендипин — классический ингибитор каналов Ca^{2+} L-типа. В эритроцитах человека обнаружены потенциалзависимые каналы Ca^{2+} L-, R-, N-типа и типа P/Q (последние

Таблица 3. Действие нитрендипина на гипотонический лизис эритроцитов человека (в %) в растворе Кребса с осмолярностью, равной значению Γ_{50} , в контроле и на фоне облучения ^{90}Sr (1,5 мкГр/ч)

Условия опыта	Негативный контроль	Концентрация нитрендипина, моль/л				
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Нитрендипин	48,7 ± 1,00	(57,5 ± 1,17)*	(42,3 ± 1,36)*	(44,5 ± 1,39)*	(40,2 ± 1,54)*	(46,2 ± 3,94)
% Относительно контроля	100,0	118,1 ± 2,4	86,9 ± 2,8	91,4 ± 2,9	82,5 ± 3,2	94,9 ± 10,1
Нитрендипин+ + ^{90}Sr	51,3 ± 1,44	(58,3 ± 1,63)*	(43,9 ± 2,84)*	(44,2 ± 1,45)*	(35,5 ± 1,92)*	(35,2 ± 3,58)*
% Относительно контроля	100,0	113,6 ± 3,2	85,6 ± 5,4	86,2 ± 2,8	69,2 ± 3,7	68,6 ± 10,9

ингибируются ω -агатовоксином), контролируемые внутриклеточными киназами и фосфатазами [10]. В цитозоле эритроцитов, не истощенных по АТФ, при действии нифедипина и нитрендипина существенное снижение Ca^{2+} отмечается только при их высоких концентрациях (0,1 ммоль/л) [11], что характерно для каналов типа P/Q. Нитрендипин при высокой концентрации (0,1 ммоль/л) снижал ОР (см. табл. 3). Как уже обсуждалось, в этой концентрации нитрендипин ингибирует вход Ca^{2+} в эритроциты с нормальным энергетическим потенциалом. Следовательно, наблюдаемое снижение стабильности мембран связано с активностью каналов Ca^{2+} . При более низких концентрациях нитрендипин действовал аналогично ионофору A23187, хотя и менее выражено. Нитрендипин в концентрациях 0,1–10 мкмоль/л ингибирует каналы $K_{\text{Ca}3,1}$ эритроцитов человека с $\text{IC}_{50} \approx 0,1$ мкмоль/л, не влияя на вход Ca^{2+} в приложенной концентрации 1 мкмоль/л [6]. Наблюдаемая однонаправленность действия кальцимицина и концентраций нитрендипина, блокирующих выход калия, на ОР эритроцитов не связана с действием последнего на кальциевые каналы. Кроме того, в эритроцитах человека к нитрендипину резистентны неселективные потенциалуправляемые ионные каналы, а также $(\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-)$ - и $(\text{K}^+, \text{Cl}^-)$ -котранспортеры [12–14], что исключает возможность включения этих каналов в механизмы развития наблюдаемых эффектов нитрендипина на ОР эритроцитов. Двухфазное действие нитрендипина может быть обусловлено его влиянием не только на трансмембранные ионные токи, но и другие сигнальные системы. Действительно, низкая чувствительность и отсутствие специфичности дипиридиновых антагонистов по отношению к каналам Ca^{2+} типа P/Q были показаны на эритроцитах [10]. Как известно, дипиридиновые антагонисты имеют высоко- и низкоаффинные центры связывания на мембранах. Высокоаффинные центры связывания идентифицированы как сайты, специфически связывающие также ингибиторы α_1 -адренорецепторов, а константы связывания дипиридиновых антагонистов с низкоаффинными сайтами коррелируют с их активностью по отношению к каналам Ca^{2+} . Это позволяет предположить, что разнонаправленное действие дипиридиновых антагонистов каналов Ca^{2+} в высоких и низких концентрациях на ОР опосредуется различными механизмами. При высоких концентрациях эффекты нитрендипина могут реализоваться прямым ингибированием потенциалуправляемых каналов Ca^{2+} , а при низких — через α_1 -адренорецепторы. Показано, что ни агонисты, ни антагонисты α -адренорецепторов не влияют на набухание эритроцитов, которое вызывается агонистами β -адренорецепторов путем повышения концентрации ионов Na^+ и K^+ в цитозоле эритроцитов [15]. Но стимуляция протеинкиназы C форболовым эфиром или диацилглицерином повышала ОР эритроцитов человека, увеличивая внутриклеточный уровень Ca^{2+} через ω -агатовоксинчувствительные каналы [10]. Следовательно, наблюдаемое увеличение ОР эритроцитов нитрендипином в низких концентрациях может быть следствием как прямой активации α_1 -адренорецепторов, так и стабилизации их мембранного цитоскелета через механизмы, которые требуют дальнейшего изучения, тем более что действие нитрендипина на калиевую проводимость через Гардос-каналы было значительно ниже, чем на ОР эритроцитов [11]. β -Излучение (1,5 мкГр) достоверно усиливало антигемолитическое действие нитрендипина только при его концентрациях 1,0 мкмоль/л и ниже. При концентрациях нитрендипина выше 1,0 мкмоль/л ионизирующее излучение фактически не влияло на его действие, а наблюдался только эффект самого нитрендипина (см. табл. 3). Нивелирование нитрендипином действия поля ИРММ, по-видимому, также связано с вызываемыми им перестройками мембранной структуры и косвенно указывает на то, что действие поля ИРММ на функциональное состояние мембраны зависит от ее исходного состояния.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что поле ИРММ модифицирует как Ca^{2+} -опосредованную, так и Ca^{2+} -независимую клеточную сигнализацию, регулирующую ОР эритроцитов. Направленность этой модификации, по-видимому, зависит от исходной структуры мембран и определяется качественными и количественными параметрами изменений мембранной структуры, вызываемых конкретными соединениями.

1. *Жирнов В. В., Гавий В. Н., Казимиров С. А.* Влияние β -излучения на поверхностный потенциал эритроцитов человека при ингибировании метаболизма эйкозаноидов // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 2. – С. 40–45.
2. *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.
3. *Zhirnov V. V., Iakovenko I. N.* Ultra-low dose beta-irradiation induces constriction of rabbit carotid arteries via the endothelium // Int. J. Rad. Biol. – 2005. – **81**, No 11. – P. 813–820.
4. *Zhirnov V. V., Khyzhnyak S. V., Votsitskiy V. M.* The effects of ultra-low dose beta-radiation on the physical properties of human erythrocyte membranes // Ibid. – 2010. – **86**, No 6. – P. 499–506.
5. *De Oliveira S., Silva-Herdade A. S., Saldanha C.* Modulation of erythrocyte deformability by PKC activity // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2008. – **39**, No 1–4. – P. 363–373.
6. *Ellory J. C., Culliford S. J., Smith P. A. et al.* Specific inhibition of Ca-activated K channels in red cells by selected dihydropyridine derivatives // Br. J. Pharmacol. – 1994. – **111**, No 3. – P. 903–905.
7. *Lang F., Busch G. L., Ritter M. et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // Phys. Rev. – 1998. – **78**, No 1. – P. 247–306.
8. *Zipser Y., Piade A., Barbul A. et al.* Ca^{2+} promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3 // Biochem. J. – 2002. – **368**, No 1. – P. 137–144.
9. *Takakawa Y., Mohandas N.* Modulation of erythrocyte membrane material properties by Ca^{2+} and calmodulin. Implications for their role in regulation of skeletal protein interactions // J. Clin. Invest. – 1988. – **82**, No 2. – P. 394–400.
10. *Andrews D. A., Yang L., Low P. S.* Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells // Blood. – 2002. – **100**, No 9. – P. 3392–3399.
11. *Celedon G., Venegas F., Campos A. M. et al.* Role of endogenous channels in red blood cells response to their exposure to the pore forming toxin Sticholysin II // Toxicol. – 2005. – **46**, No 3. – P. 297–307.
12. *Barksmann T. L., Kristensen B. I., Christophersen P., Bennekou P.* Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel: Part I. Activation by clotrimazole and analogues // Blood Cells Mol. Dis. – 2004. – **32**, No 3. – P. 384–388.
13. *Lopez-Burillo S., Agapito-Serrano M. T. et al.* Inhibition by nitrendipine of $^{86}\text{Rb}^{+}$ fluxes in subconfluent MDCK cells // Eur. J. Pharmacol: Mol. Pharmacol. – 1995. – **289**, No 2. – P. 259–265.
14. *Gibson J. S., Speake P. F., Ellory J. C.* Differential oxygen sensitivity of the $\text{K}^{+}\text{-Cl}^{-}$ cotransporter in normal and sickle human red blood cells // J. Physiol. – 1998. – **511**, No 1. – P. 225–234.
15. *Thorod S. M., Soergaard M., Cragoe J. Jr., Fugelli K.* The osmolality-sensitive taurine channel in flounder erythrocytes is strongly stimulated by noradrenaline under hypo-osmotic conditions // J. Exp. Biol. – 1995. – **198**, No 2. – P. 311–324.

V. V. Zhirnov. I. N. Iakovenko, L. V. Grubskaya

Influence of ultra-low dose β -irradiation (^{90}Sr) on human erythrocyte osmotic resistance against the background of modification of the activity of ionic fluxes

Influence of a low rate ionizing radiation (LRIR) field on the osmotic resistance (OR) of erythrocytes in the presence of ionophore A23187 and Ca^{2+} -dependent K^{+} -channel inhibitor, nitrendipine, is investigated. It is shown that β -radiation in the range of the absorbed doses of 1.5–15.0 μGy causes the essential increase of erythrocyte hypotonic lysis. Both Ca^{2+} -dependent K^{+} -channel activator (ionophore A23187) and inhibitor (nitrendipine) in the identical range of concentrations (0.1–10 $\mu\text{mol/l}$) substantially increased the OR. Ionizing radiation (1.5 $\mu\text{Gy/h}$) enhanced the action of A23187 in these concentrations. Nitrendipine in the concentration of ≥ 1 $\mu\text{mol/l}$ abolished the action of β -radiation. The results testify that the LRIR field modifies both Ca^{2+} -mediated, and Ca^{2+} -independent cell signaling, which regulates the OR of erythrocytes.