

УДК 612.11.014.4

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ

Е. К. Козлова, А. П. Черняев, А. М. Черныш, П. Ю. Алексеева

(кафедра физики ускорителей высоких энергий)

Представлены экспериментальные данные по исследованию воздействия  $\gamma$ -излучения на красные кровяные клетки человеческого организма при разной температуре для доз до 30 рентген. Скрытые мембранные повреждения эритроцитов после облучения выявлялись с помощью метода последующей электропорации калиброванным импульсом электрического поля. Предлагается математическая модель, позволяющая описать представленные результаты экспериментов и численно оценить характеристики электропорации мембран эритроцитов при действии  $\gamma$ -излучения.

Исследование особенностей действия ионизирующего излучения, в частности  $\gamma$ -излучения, как на организм в целом, так и на отдельные клетки, продолжает оставаться актуальным в связи с развитием методов лучевой терапии [1–4]. В последние годы отмечается возросший интерес к выяснению механизмов действия малых доз (менее 25 рентген) [4–6].

Цель работы: исследование влияния  $\gamma$ -излучения ( $^{226}\text{Ra}$ ) на мембраны эритроцитов крови человека с помощью метода последующей электропорации калиброванным импульсом электрического поля. Данный метод изучения действия различных физико-химических факторов на модифицированную электрическим импульсом мембрану описан нами в работах [7, 8].

Выделенные эритроциты человека помещались в 0.9% раствор NaCl (концентрация 230 млн эритроцитов на 1 мл суспензии крови). Степень воздействия  $\gamma$ -излучения оценивали методом сравнения кинетики гемолиза (гибели) эритроцитов облученной суспензии с кинетикой гемолиза эритроцитов контрольной суспензии. Количество оставшихся в суспензии клеток в данный момент времени определяли с помощью фотокolorиметрического анализа.

Известно, что повреждения от малых доз ионизирующего излучения могут оказаться скрытыми (потенциальными). Действительно, в наших опытах скорости гемолиза эритроцитов в облученной и в контрольной суспензиях статистически не отличались. Поэтому для выявления скрытых повреждений мембрану подвергали электропорации калиброванным импульсным электрическим полем клинического дефибриллятора. Напряженность электрического поля в растворе составляла 1700 В/см, что обеспечивало необратимый электрический пробой мембраны эритроцитов. Подробно методика экспериментов описана ранее в работе [8].

Для облучения суспензии эритроцитов излучением источника  $^{226}\text{Ra}$  был сконструирован металлический контейнер с высотой внутренних стенок 30 мм. В центр помещали колбу с радионуклидом,

пробирки с суспензией размещали на расстоянии 30 мм от источника. Высота суспензии в пробирке составляла 20 мм. Пробирки с суспензией подвергали действию  $\gamma$ -излучения, после этого пробирки с облученной и контрольной суспензией оставляли на сутки в темном изолированном хранилище. Затем на суспензию воздействовали импульсным электрическим полем и измеряли кинетические кривые (зависимость оптической плотности суспензии  $D$  от времени).

В экспериментах использовали излучение двух источников  $^{226}\text{Ra}$  с активностью 2.04 и 9.25 мКи, время облучения варьировалось от 5 мин до 24 ч. Опыты проводились для трех диапазонов температур суспензии крови: 14–15°C, 17–18°C и 20–21°C.

В зависимости от дозы облучения наблюдали эффекты замедления и ускорения кинетики гемолиза эритроцитов. На рис. 1 представлены кинетические кривые (кривая 2) для эритроцитов, которые облучались в течение 3 ч при температуре  $T = 19–20^\circ\text{C}$  (а) и при  $T = 14–15^\circ\text{C}$  (б) источником с активностью 2.04 мКи, а затем через 24 ч подвергались электропорации с помощью калиброванного импульса. Для сравнения представлены кинетические кривые для соответствующих контрольных суспензий для данных температур (кривая 1). На рис. 1, а кривая 2 проходит ниже кривой 1, что соответствует ускорению гемолиза. А на рис. 1, б — наоборот, выше, что соответствует его замедлению. Облученные эритроциты без последующей электропорации (кривая 3 на рис. 1) вели себя подобно клеткам в контрольной суспензии, которая не подвергалась облучению и электропорации (кривая 3' на рис. 1).

Экспериментальные кинетические кривые могут быть описаны экспоненциальной зависимостью. На рис. 2 показаны данные для характерной константы  $\lambda$  уменьшения числа эритроцитов. Данные для каждого значения дозы обработаны с помощью стандартных методов математической статистики, указаны средние значения и соответствующие ошибки. Средние результаты опытов, соответствующие разным дозам облучения, соединены для наглядности

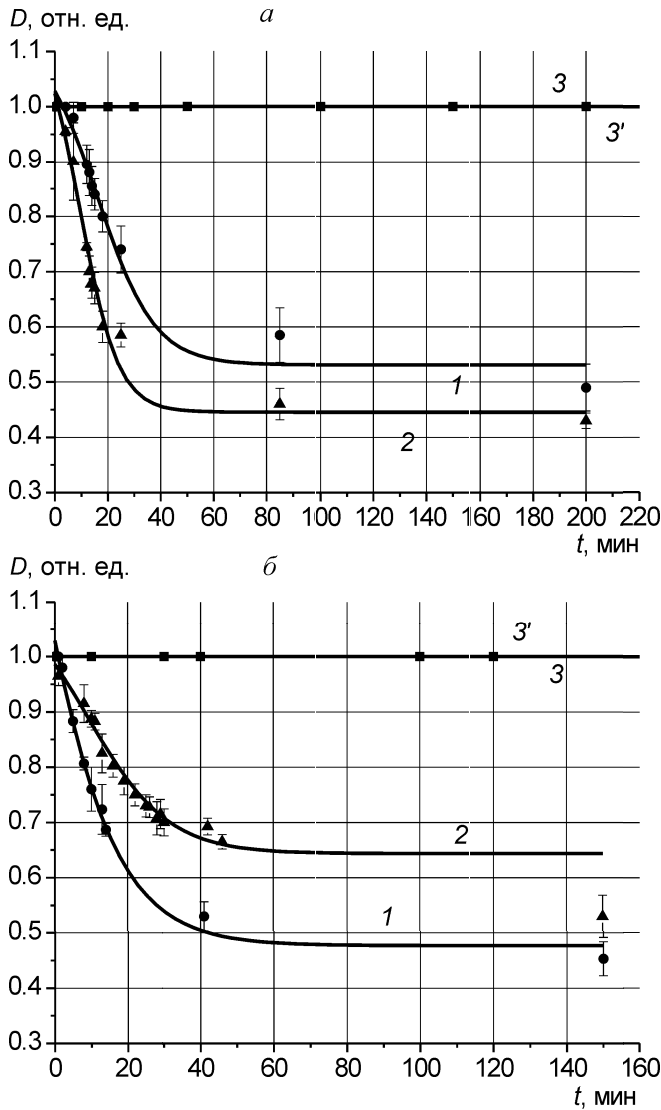


Рис. 1. Кинетические кривые  $D(t)$  ( $t$  — время после воздействия импульсным электрическим полем): (а)  $T = 19-20^\circ\text{C}$ , (б)  $T = 14-15^\circ\text{C}$ . Кривая 1 — контрольная суспензия (без облучения), кривая 2 — суспензия, облученная источником  $^{226}\text{Ra}$  (активность  $A = 2.04$  мКи, доза 4 рентген), затем через 24 ч воздействие на суспензию калиброванным импульсным электрическим полем (напряженность поля в суспензии 1700 В/см); кривая 3 — облученная суспензия через 24 ч (без электропорации), кривая 3' — без облучения и без электропорации

линиями. Проверена гипотеза о равенстве средних значений для данной дозы и для контроля (электропорация без облучения). Так, при температуре  $14-15^\circ\text{C}$  (кривая 1) при дозе 3.8 рентген наблюдалось уменьшение (достоверное различие при уровне значимости  $p = 0.005$ ), а при дозе 26 рентген результаты совпадали с контрольным. При повышении температуры до  $17-18^\circ\text{C}$  (кривая 2) замедляющий эффект наблюдался при дозе около 0.5 рентген ( $p = 0.3$ ) и сменялся на ускоряющий при дозе 0.7–1 рентген. При температуре  $20-21^\circ\text{C}$  (кривая 3) наблюдался только ускоряющий эффект. При облучении суспензии в течение 24 ч (доза 134 рентген) относительное изменение скорости составило +1.6. В случае температуры

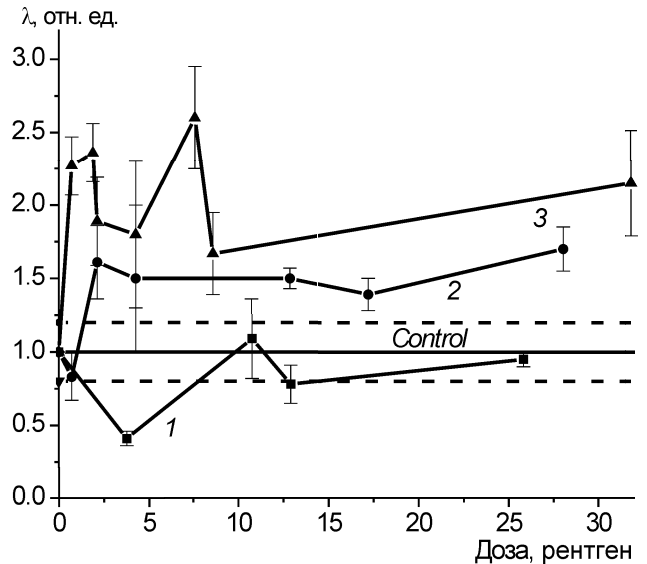


Рис. 2. Экспериментальные данные для характерной константы  $\lambda$  уменьшения числа эритроцитов в зависимости от дозы для разных температур:  $14-15^\circ\text{C}$  (1),  $17-18^\circ\text{C}$  (2),  $20-21^\circ\text{C}$  (3). Данные нормированы на среднюю величину контроля  $\lambda_{\text{control}}$  для соответствующей температуры (Control — электропорация без облучения), пунктиром показаны ошибки контроля

$11-12^\circ\text{C}$  результаты опытов для исследуемых доз (до 30 рентген) совпадали с контрольными.

Таким образом, в экспериментах наблюдали изменение величины эффекта в зависимости от дозы: замедление гемолиза сменялось его ускорением.

Экспериментальные данные показывают, что скорость уменьшения числа клеток при комбинированном воздействии импульсного электрического поля и  $\gamma$ -излучения не является суммой скоростей в результате воздействия данных факторов по отдельности. Причем этот эффект зависел от дозы  $\gamma$ -излучения. Под действием  $\gamma$ -излучения изменялись условия электрического пробоя мембран калиброванным импульсом. Количество пор и их радиус при электропорации определяются наведенным трансмембранным потенциалом  $\varphi$  и пороговым потенциалом электрического пробоя  $\varphi_p$ .

**Математическая модель.** Будем считать, что скорость уменьшения численности эритроцитов прямо пропорциональна суммарной площади пор, образуемых в мембране эритроцита в результате электропорации. Выделим поверхность мембраны единичной площади, разобьем эту площадь на  $N$  одинаковых областей, каждая из которых имеет собственные свойства и в каждой из которых может образоваться пора ( $N$  велико). Вероятность образования поры в каждой такой области зависит от собственных свойств этой области [9]. Эти свойства определяют два параметра электропорации: пороговый потенциал электрического пробоя и радиус поры. Для возникновения пор требуется, чтобы трансмембранный потенциал превысил пороговый потенциал электрического пробоя в данной области мембраны. В области, где пороговый потенциал меньше, радиус образовавшейся поры будет больше:  $r = k/\varphi_p^2$ . Даль-

нейшее увеличение радиуса образовавшейся поры зависит от состояния мембраны и от длительности электрического импульса. Набор элементарных макроскопических областей мембраны  $N$  можно рассматривать как ансамбль Гиббса.

Допустим, что  $\varphi_p$  подчиняется нормальному закону распределения. При наведенном трансмембранном потенциале  $\varphi$  поры будут образовываться в тех областях, где  $\varphi_p < \varphi$ . Найдем площадь пор, образуемых на поверхности мембраны площадью  $1 \text{ м}^2$ :

$$S = \frac{N}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{\varphi_{\min}}^{\varphi_p} \exp\left(-(\varphi_p - \varphi_{p\text{av}})^2 / 2\sigma^2\right) (k/\varphi_p^2)^2 d\varphi_p.$$

Величина  $N$  — максимальное число пор, которые могут уместиться на рассматриваемой поверхности мембраны площадью  $1 \text{ м}^2$  при условии, что радиус поры минимален,  $\varphi_{p\text{av}}$  — среднее по ансамблю областей  $N$  значение порогового потенциала (средний пороговый потенциал в каждом участке мембраны определяется ее состоянием и ее микропараметрами [9]),  $\sigma$  — среднее квадратическое отклонение. Предел интегрирования  $\varphi_p = \varphi$ . Наведенная на клетку разность потенциалов  $\varphi_k$  зависит от напряженности электрического поля в растворе  $\mathbf{E}$  и радиуса клетки  $\mathbf{r}$ :  $\varphi_k = 1.5Er \cos \theta$ ,  $\theta$  — угол между вектором  $\mathbf{E}$  и радиус-вектором точки наблюдения на сфере.

В результате воздействия на суспензию эритроцитов  $\gamma$ -излучения поверхностный заряд эритроцита и  $\zeta$ -потенциал уменьшаются [4]. Допустим,  $\zeta$ -потенциал уменьшается с увеличением дозы по закону  $\zeta = \zeta_0 \exp(-k(T)D)$ , где  $D$  — экспозиционная доза,  $\zeta_0$  соответствует нулевой дозе. С ростом температуры коэффициент  $k(T)$  растет. В данной модели не рассматриваются электрокинетические явления в суспензии. Величина  $\zeta_0$  уменьшается с течением времени хранения эритроцитов в суспензии [10, 11] и тем быстрее, чем выше температура. Изменение  $\zeta$ -потенциала влияет на трансмембранный потенциал  $\varphi$ , причем по-разному на поверхностях клетки, обращенных к катоду и аноду. Со стороны поверхности клетки, повернутой к катоду, результирующий потенциал  $\varphi_c = -|\varphi_k/2| - |\zeta|$ , к аноду:  $\varphi_a = |\varphi_k/2| - |\zeta|$ , где  $\zeta$ -потенциал. В результате изменяется предел интегрирования в формуле (1) и соответственно суммарная площадь пор. Введем коэффициент  $K_\zeta$ , который характеризует относительное уменьшение суммарной площади пор за счет уменьшения  $\zeta$ -потенциала.

Продукты ионизации, локализуясь на поверхности эритроцита, могут изменить порог электропорации данной области. В результате суммарная площадь пор в мембране увеличится на величину  $\Delta S$ . В наших расчетах учитывается многократное повреждение эритроцита продуктами ионизации, образующимися непосредственно у поверхности эритроцита, с учетом их концентрации в суспензии:

$\Delta S_1 = \pi R^2 2 \left( \left( (2 \cdot 10^9 D)^{1/3} \right) / 4 \right)^2$ . Эта зависимость хорошо согласуется с известной экспоненциальной зависимостью доли эритроцитов, получивших одно повреждение, от дозы  $\gamma$ -излучения [12]. Кроме этого учитывается повреждение мембраны эритроцита продуктами радиолитиза, возникающими в объеме раствора:  $\Delta S_2 = a\pi R^2 2 \left( \left( (2 \cdot 10^9 D)^{1/3} \right) / 2 \right)^2$ . Этот эффект усиливается с повышением температуры, соответственно увеличивается коэффициент  $a$ . Введем коэффициент  $K_p$ , характеризующий относительное увеличение суммарной площади за счет уменьшения порогового потенциала в локальных участках мембраны.

В результате относительное изменение суммарной площади пор, возникающих при электропорации, облученной и контрольной суспензий, будет определяться величиной произведения этих коэффициентов:  $K = K_\zeta K_p$ . На рис. 3 приведена расчетная зависимость данного коэффициента от дозы  $K(D)$  для разных значений температуры (14–15°C, 17–18°C, 20–21°C). Расчеты выполнены для следующих параметров:  $\zeta_0 = 50 \text{ мВ}$ ,  $k = 10$ ,  $a = 2$  ( $T = 14\text{--}15^\circ\text{C}$ );  $\zeta_0 = 30$ ,  $k = 60$ ,  $a = 3$  ( $T = 17\text{--}18^\circ\text{C}$ );  $\zeta_0 = 0$ ,  $a = 3.5$  ( $T = 20\text{--}21^\circ\text{C}$ );  $R = 30 \text{ нм}$  при  $\varphi_p = 0.18 \text{ В}$ . Результаты расчетов (рис. 3) согласуются с экспериментальными данными, представленными на рис. 2. Величина дозы, при которой замедляющий эффект переходит в ускоряющий, уменьшается при увеличении температуры.

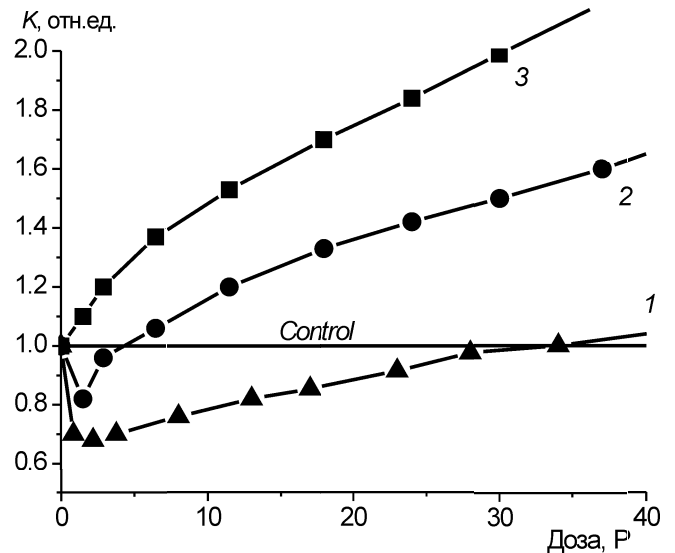


Рис. 3. Расчетные данные относительной скорости уменьшения числа эритроцитов в зависимости от дозы  $K(D)$  для различных значений температуры: 14–15°C (1), 17–18°C (2), 20–21°C (3). За единицу принята скорость уменьшения числа эритроцитов после электропорации без облучения (Control — контроль)

Предложенная математическая модель позволила описать представленные результаты экспериментов и численно оценить характеристики электропорации мембран эритроцитов при действии  $\gamma$ -излучения.

В рамках данной модели может быть решена обратная задача: исследование функции уменьшения поверхностного заряда эритроцитов под воздействием ионизирующего излучения. Экспериментальный подход, представленный в статье, позволит в дальнейшем исследовать механизм биофизического действия малых доз облучения на биологические клетки.

Авторы выражают благодарность д.ф.-м.н., профессору Б.С. Ишханову, а также сотруднику НИИЯФ МГУ В.И. Смирнову за поддержку и совместное проведение экспериментов в НИИЯФ МГУ им. Д.В. Скобельцына.

#### Литература

1. *Sharifi S., Dzik W.H., Sadrzadeh S.M.* // *Transfus. Med.* 2000. **10**, N 2. P. 125.
2. *Hao J., Luo Q., Xiong G.* // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2001. **23**, N 1. P. 21.
3. *Koziczak R., Krokosz A., Szweda-Levandowska Z.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999. **47**, N 5. P. 865.
4. *Zima G.V., Drevval' V.I.* // *The Radiats. Biol. Radioecol.* 2000. **40**, N 3. P. 261.
5. *Ulsh B.A., Miller S.M., Mallory F.F. et.al.* // *J. Environ. Radioact.* 2004. **74**, N 1. P. 73.
6. *Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л.* // *Химическая физика.* 2003. **22**, № 2. С. 21.
7. *Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М. и др.* // *Медицинская физика.* 2003. **17**, № 1. С. 50.
8. *Мороз В.В., Богушевич М.С., Черныш А.М. и др.* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2004. **137**, № 2. С. 140.
9. *De Bruin K., Krassowska W.* // *Biophys. J.* 1999. **77**, N 3. P. 1213.
10. *Godin C., Caprani A.* // *Eur. Biophys. J.* 1997. **26**, N 2. P. 175.
11. *Lu W.H., Deng W.H., Liu S.T. et.al.* // *Anal. Biochem.* 2003. **314**, N 2. P. 194.
12. *Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С.* // *Основы радиационной биофизики.* М., 1982.

Поступила в редакцию  
19.07.04