

УДК 612.11.014.4

ДИАГНОСТИКА СКРЫТЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПРИ ДЕЙСТВИИ МАЛЫХ ДОЗ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ

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

А. А. Долгополова, М. А. Назарова

(кафедра физики ускорителей высоких энергий)

Представлены экспериментальные данные по исследованию воздействия γ -излучения в малых дозах на мембрану эритроцитов человека. Выявление скрытых мембранных повреждений эритроцитов после облучения ^{226}Ra проводили методом воздействия калиброванным импульсом электрического поля. Данный метод сравнивается с классическим методом оценки состояния мембраны с помощью измерения осмотической резистентности. Предлагается математическая модель, адекватно описывающая экспериментальные результаты.

Исследование биологической мембраны как объекта радиационного воздействия является актуальной проблемой современной физики и биофизики [1, 2]. Целью данной работы было экспериментальное исследование скрытых изменений биофизических свойств мембран в результате воздействия слабого γ -излучения. Исследования проводили с помощью метода калиброванной электропорации мембран, позволяющего оценить изменения свойств мембран на начальных стадиях повреждения [3, 4]. Для сравнения приведены данные тех же экспериментов, полученные с помощью метода измерения осмотической резистентности.

Методика и результаты экспериментов

Суспензию эритроцитов человека (3 мл) через час после приготовления облучали γ -квантами от источника ^{226}Ra в течение 30 мин. При этом поглощенная доза составляла 2.5 Р. После облучения суспензию подвергали действию импульсного электрического поля (ИЭП) (напряженность поля в растворе $E = 1700$ В/см, длительность импуль-

са 6 мс), вызывающего электропорацию мембран эритроцитов. Эффект от воздействия γ -излучения оценивали по скорости гемолиза эритроцитов. Методика приготовления суспензии эритроцитов и выбор рабочих параметров ионизирующего излучения, импульсного электрического поля и температуры подробно изложены в работах [3, 4].

Кинетика изменения состояния мембраны в течение нескольких суток после приготовления представлена на рис. 1. На рис. 1, а приведены зависимости скоростей уменьшения числа эритроцитов от времени в результате воздействия ИЭП на предварительно облученную и необлученную суспензии $V(t)$. Скорость уменьшения числа эритроцитов определяется как $V = \Delta n / \Delta t$, Δn — изменение числа эритроцитов за промежуток времени после воздействия ИЭП, $\Delta t = 20$ мин. Скорость гемолиза в результате электропорации в первые сутки после облучения возрастала, на вторые и третьи уменьшалась, а на четвертые снова возрастала (кривая 1). Для сравнения представлены соответствующие результаты для контрольной необлученной суспензии (V_{control} ,

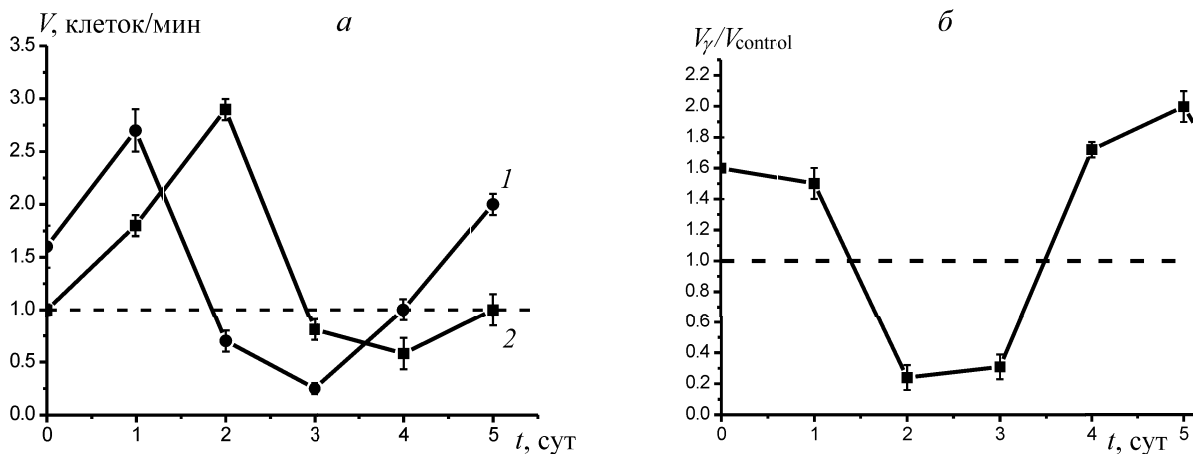


Рис. 1. Скорость изменения числа эритроцитов в результате электропорации в зависимости от времени после приготовления суспензии $V(t)$: (а) для облученной (1) и необлученной (2) суспензий (за единицу принята скорость для контрольной суспензии в день ее приготовления); (б) отношение скоростей $V_{\gamma}/V_{\text{control}}$. Источник ^{226}Ra с активностью $A = 9.25$ мКи, доза облучения 5 Р, температура $t = 20$ °С. Оптическая плотность суспензий до электропорации во всех опытах была равна единице

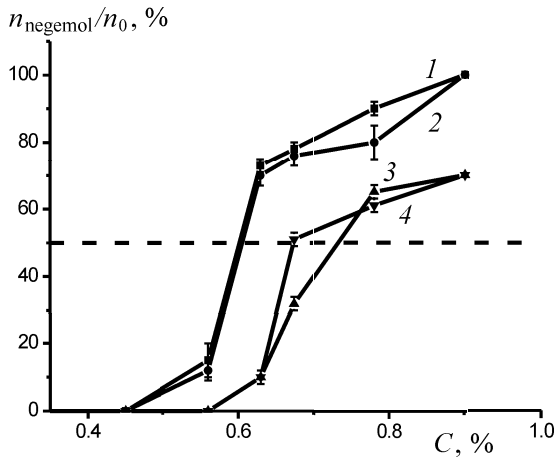


Рис. 2. Зависимость доли негемолизированных эритроцитов в суспензии ($n_{negemol}/n_0$) от концентрации соли NaCl (C). Первые сутки: 1 — контрольная суспензия, 2 — суспензия после облучения. Пятые сутки: 3 — контрольная суспензия, 4 — после облучения

кривая 2). Характер кривых для облученной и необлученной суспензий одинаков, однако кривая 1 смещена относительно кривой 2 по оси времени на сутки.

На рис. 1, б приведена зависимость отношения скоростей $V_\gamma/V_{control}$ от времени после приготовления суспензии. В первые сутки $V_\gamma > V_{control}$. В условиях наших опытов $(V_\gamma/V_{control}) = 1.6 \pm 0.2$ ($\alpha = 0.95$). На вторые и третьи сутки наблюдался обратный эффект: $V_\gamma < V_{control}$. При этом в течение первых пяти суток оптическая плотность облученной и необлученной суспензии без электропорации не изменялась и равнялась исходной ($D_0 = 1$).

Метод электропорации позволил проявить скрытые эффекты воздействия γ -излучения на мембраны уже в первые сутки после облучения. Наша методика выявления скрытых повреждений была сопоставлена с классической, которая дает информацию о состоянии мембраны с помощью измерения осмотической резистентности, которая определяется по концентрации соли NaCl $C_{50\%}$, при которой гемолизируется 50% исходных эритроцитов [5]. Однако значимого различия между осмотической резистентностью облученной и контрольной суспензий этот метод не показал ни в первые, ни в последующие сутки (рис. 2). Осмотическая резистентность уменьшалась одинаково как для облученной, так и для необлученной суспензии в первые сутки и пятые, когда оптическая плотность суспензии становилась меньше единицы.

Модель

Количество возникающих в мембране пор и их радиус в результате действия ИЭП определяются наведенным трансмембранным потенциалом и пороговым потенциалом электрического пробоя φ_p . Под действием γ -излучения изменяются локальные свойства биомембран, а следовательно, и φ_p . Выделим поверхность мембраны единичной площади. Разобьем эту площадь на N одинаковых областей,

в каждой из них может образоваться пора. Число областей N велико. Образование поры в каждой такой области зависит от собственных свойств этой области. Мембрана эритроцита изначально неоднородна по своим электрохимическим свойствам. Белки, разные сорта липидов, границы межмолекулярных разделов, наличие ионных каналов, аквапор, асимметрия липидов на внутренних и внешних сторонах клетки, наличие дефектов в мембранах являются причиной этих неоднородностей. Поэтому в различных участках мембраны потенциалы φ_p неодинаковые. Собственные свойства каждого из N участков определяют два параметра электропорации: φ_p и радиус поры. Набор элементарных макроскопических областей мембраны N можно рассматривать как статистический ансамбль. Выделим в фазовом пространстве состояний объем $d\varphi_p$ около точки φ_p . В данный момент времени в этом объеме заключены точки, характеризующие состояния dN систем ансамбля из их полного числа N . Тогда предел отношения $\lim_{N \rightarrow \infty} \left(\frac{dN}{N}\right) = f_N(\varphi_p, t) d\varphi_p$

определяет плотность распределения (функцию статистического распределения) микроскопических состояний систем ансамбля в момент времени t . Для расчета суммарной площади образовавшихся пор необходимо вычислить интеграл

$$S = \frac{N}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{\varphi_{min}}^{\varphi} \exp\left(-\frac{(\varphi_p - \varphi_{psr})^2}{2\sigma^2}\right) \left(\frac{k}{\varphi_p}\right)^2 d\varphi_p,$$

где φ_{psr} — средний по мембране пороговый потенциал; φ_{min} — минимальный потенциал, при котором в мембране образуется одна пора, k — коэффициент, характеризующий связь радиуса поры с пороговым потенциалом в данной области мембраны.

Развитие процессов перекисного окисления липидов после облучения приводит к их структурным нарушениям, проявляющимся через несколько суток [1]. Наряду с этим уменьшается поверхностный заряд эритроцитов [6]. Оба этих процесса наблюдаются и для необлученной крови, но с меньшими скоростями. Известно, что при хранении цельной крови, даже при пониженной температуре, через несколько суток начинается интенсивный процесс уменьшения поверхностного заряда эритроцитов [7].

В результате облучения в мембране возникает второй статистический ансамбль N_γ , площадь повреждения за счет этого ансамбля S_γ . За счет перекисного окисления средний пороговый потенциал уменьшается: $\varphi_{psr}(t) = \varphi_{psr0} \exp(-\lambda t)$, где $\varphi_{psr0} = \varphi_{psr}(0)$, λ — показатель уменьшения среднего потенциала. Поверхностный заряд и соответственно поверхностный потенциал в результате облучения начинают уменьшаться со временем, причем быстрее, чем для необлученной суспензии: $\psi_s = \psi_{s0} \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{t-t_q}{\sigma_q}\right)\right)$, ψ_{s0} — поверхностный потенциал сразу после приготовления суспензии,

t_q, σ_q — константы. В этом случае изменятся трансмембранные потенциалы со стороны катода и анода:

$$\varphi_c = -|\varphi_{\text{cell}}/2| - |\psi_s|, \quad \varphi_a = -|\varphi_{\text{cell}}/2| - |\psi_p|.$$

Тогда суммарная площадь образовавшихся пор $S_\gamma + S = \frac{N+N_{\gamma 0}}{\sigma\sqrt{2\pi}}(A_1 + A_2)$, где

$$A_1 = \int_{\varphi_{\min}}^{\varphi_c} \exp\left(-\frac{(\varphi_p - \varphi_{p\text{sr}})^2}{2\sigma^2}\right) \left(\frac{k}{\varphi_p}\right)^2 d\varphi_p,$$

$$A_2 = \int_{\varphi_{\min}}^{\varphi_a} \exp\left(-\frac{(\varphi_p - \varphi_{p\text{sr}})^2}{2\sigma^2}\right) \left(\frac{k}{\varphi_p}\right)^2 d\varphi_p.$$

Отношение скоростей уменьшения числа эритроцитов определяется отношением соответствующих площадей:

$$V_\gamma/V_{\text{control}} = (S_\gamma + S)/S.$$

При этом увеличение активных центров электропорации в результате облучения будет приводить

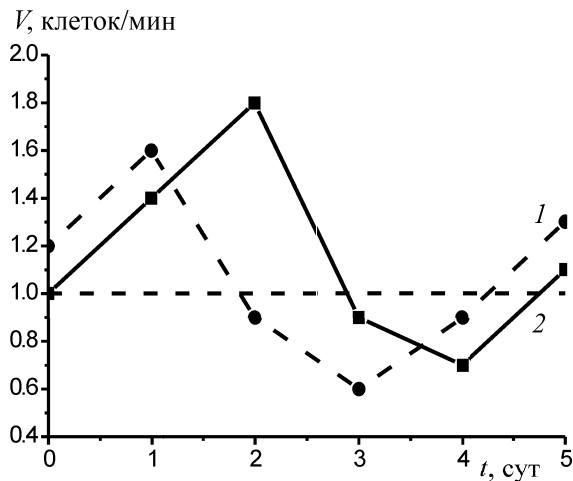


Рис. 3. Теоретические данные для скорости изменения числа эритроцитов в результате электропорации в зависимости от времени после приготовления суспензии $V(t)$ для облученной (1) и необлученной (2) суспензий. За единицу принята скорость для контрольной суспензии в день ее приготовления ($\lambda = 0.013 \text{ сут}^{-1}$, $t_q = 3 \text{ сут}$, $t_{q\gamma} = 2 \text{ сут}$, $\sigma_q = 1 \text{ сут}$)

к увеличению этого отношения, а уменьшение поверхностного заряда — к уменьшению. Различие кинетики увеличения активных центров и изменения поверхностного заряда и приводит к изменению во времени отношения $V_\gamma/V_{\text{control}}(t)$ (рис. 3). Таким образом, зависимость $V_\gamma/V_{\text{control}}(t)$ может быть использована в качестве рабочей характеристики биосенсора γ -излучения.

Выводы

Метод электропорации позволил исследовать кинетику биофизических изменений в мембранах эритроцитов, возникающих в результате воздействия γ -излучения с дозой 2.5 Р. Разработана математическая модель, адекватно описывающая экспериментальные результаты.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику НИИЯФ МГУ В. И. Смирнову за помощь в проведении экспериментов.

Литература

1. Benderitter M., Vincent-Genod L., Pouget J. et al. // Rad. Res. 2003. **159**, N 4. P. 471.
2. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М., 2004.
3. Козлова Е.К., Черняев А.П., Шведунов В.И. и др. // Биомед. технол. и радиоэлектроника. 2004. № 6. С. 65.
4. Козлова Е.К., Черняев А.П., Алексеева П.Ю. и др. // Тр. V Межвузовской научной школы молодых специалистов «Концентрированные потоки энергии в космической технике, электронике, экологии и медицине», НИИЯФ МГУ, 22–23 ноября 2004 г. С. 105.
5. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. Т. 2. М., 1996. С. 422.
6. Зима Г.В., Древаль В.И. // Радиц. биол. радиоэкол. 2000. **40**, № 3. С. 261.
7. Godin C., Caprani A. // Eur. Biophys. J. 1997. **26**, N 2. P. 175.

Поступила в редакцию
06.05.05