

## БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 577.346+591.111

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ДО И ПОСЛЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Л. В. Батюк<sup>1</sup>, С. В. Гаташ<sup>2</sup>, О. А. Горобченко<sup>2</sup>, О. Т. Николов<sup>2</sup><sup>1</sup> *Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева,**ул. Пушкинская 82, Харьков, Украина, 61024; e-mail: liland@kharkov.ukrtel.net*<sup>2</sup> *Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина,**пл. Свободы 4 Харьков, Украина, 61077; e-mail: sergiy.v.gatash@univer.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 3 сентября 2003 г.

Методом СВЧ-дieleктрометрии в интервале температур 1-47 °С исследованы температурные зависимости частоты dielectricкой релаксации молекул воды суспензии эритроцитов и их теней и степени их гидратации в норме и при злокачественных опухолях до и после лучевой терапии. Показано, что структурные переходы эритроцитарных мембран онкологических больных в области температур 8-15 °С сопровождаются изменением водной проницаемости мембраны и соотношения свободной и связанной эритроцитами воды. При развитии опухолевого процесса происходит рост гидратации мембран эритроцитов (увеличение толщины гидратного слоя), что замедляет диффузию воды через мембрану. После лучевой терапии степень гидратации мембран эритроцитов уменьшается в результате их структурно-молекулярных перестроек.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эритроциты, тени, частота dielectricкой релаксации, dielectricкая проницаемость, гидратация, температура, СВЧ-дieleктрометрия.

Известно, что основными проявлениями опухолевого роста в организме уже на ранних стадиях являются изменения биохимических и структурно-функциональных характеристик крови [1]. Когда регулирующие системы или эффекторные органы, через которые осуществляется контроль гомеостаза, повреждаются опухолью или продуктами метаболизма опухоли, развиваются водно-электролитные нарушения [2,3]. В протоплазме клеток содержится много калия, фосфора, пуринов и других веществ, которые наводняют межклеточные пространства после лизиса клеток злокачественной опухоли. Такое внезапное поступление большого количества продуктов клеточного распада может превысить способность организма к их выведению, что, естественно, приводит к нарушению электролитного равновесия [4].

Проблема лечения и профилактики онкологических заболеваний является одной из актуальных проблем медицины не только в Украине, но и во всем мире, и обусловлена ростом числа заболеваний, инвалидности и смертности от рака [5-7]. К настоящему времени накоплен значительный клинический и экспериментальный материал, освещающий количественные и качественные изменения периферической крови и костного мозга при воздействии ионизирующей радиации. Несмотря на это, исследование влияния лучевой терапии на организм больного по-прежнему является актуальным в связи с возможным возникновением лучевых патологий. Следует отметить недостаточность экспериментальных и клинических данных, отражающих суть процессов, развивающихся после облучения на субклеточном и клеточном уровнях [8, 9]. Поэтому для повышения противоопухолевого эффекта лучевой терапии необходимо их более глубокое изучение.

Вода составляет основную часть клетки и заполняет межклеточное пространство, она является средой, в которой протекают все процессы метаболизма и важным структурным компонентом мембраны, обеспечивающим бислоюную упаковку и определенное фазовое состояние липидов, а также функциональную активность структуры мембраны в целом [10-14]. Комплекс нарушений, обнаруженный в эритроцитах, связан со структурными перестройками мембран и должен сопровождаться изменением степени гидратации мембранных компонент [15]. Изменение гидратации в свою очередь влияет на структуру и функциональную активность биологической системы в целом [16, 17]. Учитывая общность структурной организации и особенностей функционирования эритроцитарных и других клеточных мембран, за мембраной эритроцита признается право отражать состояние клеток и служить показателем меры их вовлечения в патологический процесс [18].

Возможность применения метода СВЧ-дieleктрометрии для изучения гидратации веществ определяется тем, что молекулы связанной воды и растворенного вещества в сантиметровом диапазоне длин волн менее подвижны, чем молекулы свободной воды [19]. Метод СВЧ-дieleктрометрии дает возможность исследовать изменение гидратации, как параметра, отвечающего на функциональные

изменения мембран [20]. Анализ диэлектрических показателей эритроцитов крови у онкологических больных позволит получить дополнительную информацию о состоянии воды непосредственно в мембранах эритроцитов при опухолевом процессе, что представляет интерес в связи с разработкой физико-химических методов диагностики злокачественных заболеваний.

В данной работе представлены результаты исследования времени диэлектрической релаксации молекул воды в суспензии эритроцитов и теней и степени их гидратации в норме и при злокачественных опухолях до и после лучевой терапии в интервале температур 1-47 °С.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали эритроциты и их тени, полученные из крови доноров и онкологических больных, средний возраст которых составил  $47 \pm 4$  года. В группе больных раком грудной железы (РГЖ), численностью 31 человек, согласно международной классификации по системе TNM больные распределялись следующим образом: T2N1M0 (вторая стадия заболевания, без признаков отдаленных метастазов) - 55,1 %, T3N1M0 (третья стадия, без признаков отдаленных метастазов) - 44,9 %. Группа получала послеоперационную лучевую терапию в режиме классического фракционирования – разовая очаговая доза (РОД) на опухоль составила 6 Гр, суммарная очаговая доза (СОД) – 45 Гр. Группа больных раком легких (РЛ), 31 чел., получала лучевую терапию как самостоятельный курс в режиме классического фракционирования: РОД 1,8-2,2 Гр, СОД 45-50 Гр. Лучевую терапию проводили с использованием гамма-излучения  $^{60}\text{Co}$  на терапевтическом аппарате РОКУС-АМ. По стадиям заболевания больные распределялись: T2N2M0 - 63,4 %, T3N1M0 - 36,6 %. Контрольную группу составили 30 доноров.

Забор крови проводили пункцией вены до, и после облучения. Методика приготовления образцов подробно описана ранее [21]. Исследование диэлектрических характеристик суспензии эритроцитов и их теней в области температур 1-47 °С проводилось на СВЧ-диэлектрометре резонантного типа на частоте 9,2 ГГц [22]. Линейный характер зависимости действительной ( $\epsilon'$ ) и мнимой ( $\epsilon''$ ) частей комплексной диэлектрической проницаемости от концентрации эритроцитов свидетельствует, что диэлектрические свойства растворителя не зависят от концентрации клеток. Вычислив время диэлектрической релаксации молекул воды  $\tau$ , изменение свободной энергии активации дипольной релаксации молекул воды в изучаемых системах находили с помощью соотношения, приведенного в [23]. Оценка гидратации производилась по формуле  $\Delta\epsilon_s = \epsilon_s^w - \epsilon_s^s$ , где  $\Delta\epsilon_s$  – декремент статической диэлектрической проницаемости раствора относительно растворителя, а  $\epsilon_s^w$  и  $\epsilon_s^s$  – статические диэлектрические проницаемости растворителя и раствора [24]. Полученные результаты были обработаны статистически с применением программного пакета STATISTICA/w (США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее проведенные исследования диэлектрических свойств мембран эритроцитов доноров и онкологических больных на этапе до применения противоопухолевых методов лечения в области температуры 1-47 °С выявили ряд особенностей, заключающихся в отклонении температурной зависимости от монотонного вида при 6-12 °С (для теней и эритроцитов доноров и онкологических больных) и 42-44 °С (для эритроцитов онкологических больных) [21]. Характер температурных зависимостей диэлектрических параметров  $\epsilon'$  и  $\epsilon''$  для теней и суспензии эритроцитов онкологических больных дает возможность предположить более высокую вероятность инициации дефектов в мембранах эритроцитов в интервале температур 6-12 °С по сравнению с температурной областью 42-44 °С и более низкую вероятность их замыкания в температурном интервале 15-42 °С [21]. Влияние температуры на состояние компонентов цитоскелета и мембраны эритроцита является прямым, оно не опосредуется изменениями макроскопических параметров клетки, таких как объем и форма. Для температурного фактора можно выделить специфическую компоненту влияния, которая заключается в изменении фазово-структурного состояния мембраны и цитоскелета клетки [25-27]. При изменении температуры в липидном матриксе происходят фазовые переходы с выделением обособленных участков, которые различаются по характеру упаковки липидных молекул и появлению пограничных участков между ними, в которых в результате нарушения упаковки липидных молекул формируются дефекты структуры бислоя [28, 29]. Цитоскелет, как протяжная белковая структура, также испытывает изменение фазового состояния, что сказывается на распределении белков цитоскелета от изотропного к анизотропному и на формировании стабильной структуры [30].

Используя значения действительной ( $\epsilon'$ ) и мнимой частей ( $\epsilon''$ ) комплексной диэлектрической проницаемости, полученные для теней и суспензии эритроцитов доноров и онкологических больных, было вычислено изменение энергии активации дипольной релаксации молекул воды в изучаемых системах при нагревании. Соответствующие Аррениусовы зависимости времени релаксации воды в

образцах клеток доноров и онкологических больных до и после лучевой терапии представлены на рисунках 1-4.

Для суспензии эритроцитов доноров в интервалах температур 6-12 °С, 17-40 °С и 43-46 °С наблюдаются изломы на Аррениусовых зависимостях. Эти переходы сопровождаются повышением энергии активации на 18,4 кДж/моль при 12 °С, снижением на 4,6 кДж/моль при 37 °С и ростом энергии активации в температурном интервале 43-46 °С на 17,3 кДж/моль. Поскольку энергия активации водородной связи оценивается в 12,5 кДж/моль [38], то в исследуемых системах каждая молекула воды образует от 1,2 до 1,4 Н-связи с соседними молекулами. Для суспензии эритроцитов онкологических больных изменения энергии активации, сопровождаемые изменением частоты диэлектрической релаксации молекул  $H_2O$  в образцах, наблюдаются в диапазоне температур 9-18 °С, 43-46 °С (рак грудной железы) и 23-37 °С (рак легких). Для больных РГЖ наблюдается повышение энергии активации в температурных интервалах 9-18 и 43-46 °С на 9,8 и 14,7 кДж/моль соответственно. Для больных РЛ энергия активации снижается на 8,3 кДж/моль при температуре 23-37 °С. Для теней эритроцитов больных РЛ и РГЖ наблюдается снижение энергии активации в интервале температур 5-8 и 8-15 °С на 4,2 и 1,4 кДж/моль. Разрыв или изменение наклона зависимостей в области данных температур может свидетельствовать о структурной перестройке мембран эритроцитов онкологических больных, в частности о появлении клеток с разреженной внутренней структурой и полостями, сморщивании наружной мембраны, везикуляции и разрыве плазмолеммы [37].

После лучевой терапии существенных изменений в показателях энергии активации диэлектрической релаксации молекул воды в суспензии эритроцитов больных РГЖ и РЛ не наблюдается. Для теней эритроцитов онкологических больных наблюдается рост показателя энергии активации на 5,5Дж/моль в интервале температур 5-8 °С (для больных РГЖ) и на 3 кДж/моль в интервале 8-15 °С (для больных РЛ). Аррениусовы зависимости времени диэлектрической релаксации молекул воды для суспензии эритроцитов онкологических больных после лучевой терапии приближаются к показателям здоровых доноров, что свидетельствует об увеличении в системах количества связанной воды (рис. 1-4).

Температурные зависимости декремента статической диэлектрической проницаемости ( $\Delta\epsilon_s$ ) суспензии эритроцитов в хлористом натрии и теней относительного 5 мМ Na-фосфатного буфера представлены на рисунке 5-6.

Известно, что величина  $\Delta\epsilon_s$  раствора относительно растворителя пропорциональна концентрации растворенного вещества и его гидратации [24]. В случае с эритроцитами концентрация клеток с ростом температуры не меняется, и температурозависимые изменения  $\Delta\epsilon_s$  определяются степенью связывания воды эритроцитами. Степень гидратации мембраны эритроцитов доноров и онкологических больных, выраженная через  $\Delta\epsilon_s$ , уменьшается в области температур от 2 до 15°С, а затем увеличивается с ростом температуры. В интервале температур 18-32 °С наблюдаются немонотонные изменения  $\Delta\epsilon_s$  суспензии эритроцитов и их теней, что свидетельствует об увеличении гидратации мембран эритроцитов (рис.5).

Температурные зависимости декремента статической диэлектрической проницаемости ( $\Delta\epsilon_s$ ) суспензии эритроцитов в хлористом натрии и теней относительного 5 мМ Na-фосфатного буфера после применения лучевой терапии показаны на рис. 6. При РГЖ и РЛ, где под облучение попадает значительная часть очагов кроветворения (грудина, ребра, позвоночник) [35, 36], лучевая терапия, осуществляя значительное влияние на организм больного, служит дополнительным фактором изменения структурно-функционального состояния мембран красных клеток крови [8, 31-34]. Тем не менее, степень гидратации мембран эритроцитов онкологических больных после лучевой терапии приближается к показателям доноров, что может быть объяснено влиянием лучевой терапии на структурно-молекулярные перестройки мембран клеток.

Представленные результаты коррелируют с полученными ранее данными об изменении энергии активации процесса диэлектрической релаксации молекул воды в суспензии и тенях эритроцитов. Для суспензии эритроцитов здоровых доноров, в системах которых преобладают диполь-дипольные взаимодействия или инициируется формирование дополнительных Н-связей, слой упорядоченной воды больше. Структурный переход в мембранах эритроцитов онкологических больных в области 8-15 °С и 42-46 °С сопровождается изменением соотношения свободной и связанной воды (рис. 5, 6).

В литературе неоднократно указывалось, что изменения липидного состава и жирно-кислотного спектра мембран онкологических больных может приводить к образованию менее плотной углеводородной зоны в центре бислоя и к меньшей его структурной прочности [39-42]. Сопоставление этих данных с полученными нами результатами показывает, что в области 8-15 °С в эритроцитарной мембране онкологических больных происходит переход, который может инициироваться в зоне прибрежковых фосфолипидов. Для доноров подобные изменения наблюдаются в области температур 6-12°С.

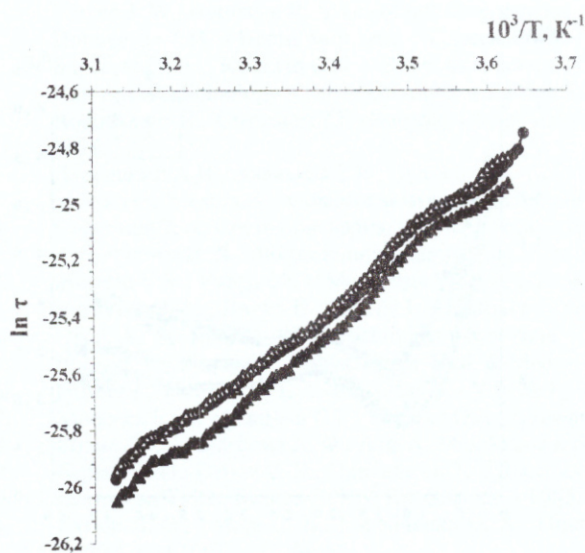


Рис.1. Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах: ● – суспензия эритроцитов доноров, ▲ – суспензия эритроцитов больных РГЖ до лучевой терапии, Δ – суспензия эритроцитов больных РГЖ после лучевой терапии.

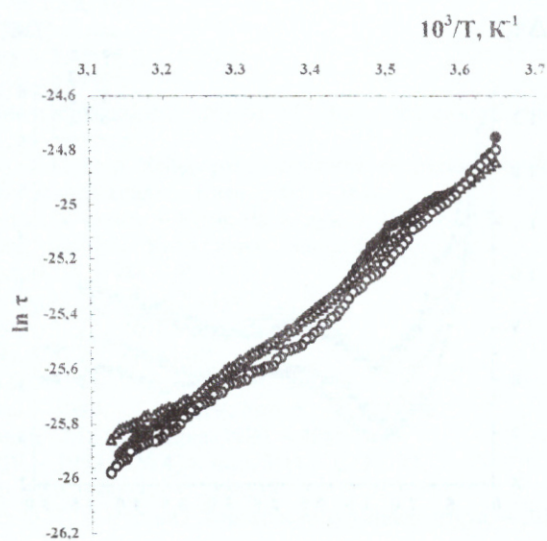


Рис.2. Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах: ● – суспензия эритроцитов доноров, ○ – суспензия эритроцитов больных РЛ до лучевой терапии, Δ – суспензия эритроцитов больных РЛ после лучевой терапии.

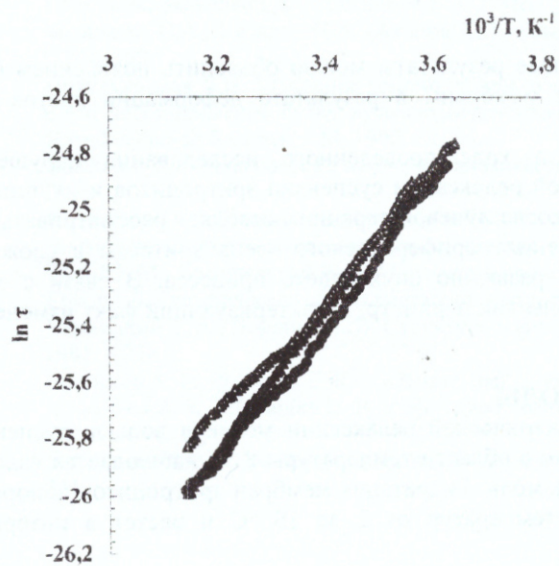


Рис.3. Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах: ● – тени эритроцитов доноров, ▲ – тени эритроцитов больных РГЖ до лучевой терапии, Δ – тени эритроцитов больных РГЖ после лучевой терапии.

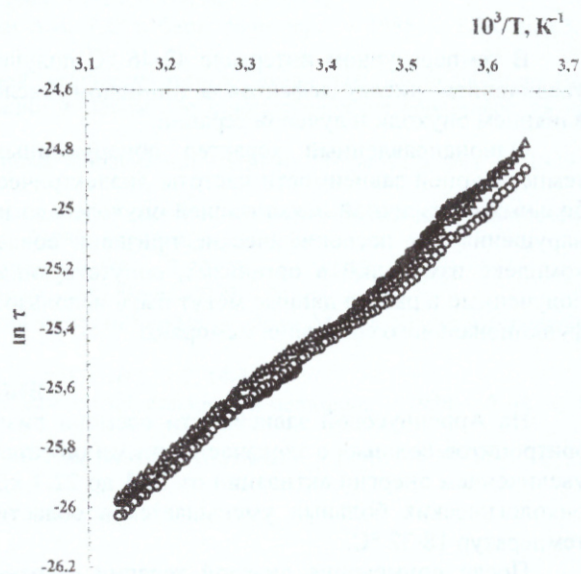


Рис.4. Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах: ● – тени эритроцитов доноров, ○ – тени эритроцитов больных РЛ до лучевой терапии, Δ – тени эритроцитов больных РЛ после лучевой терапии.

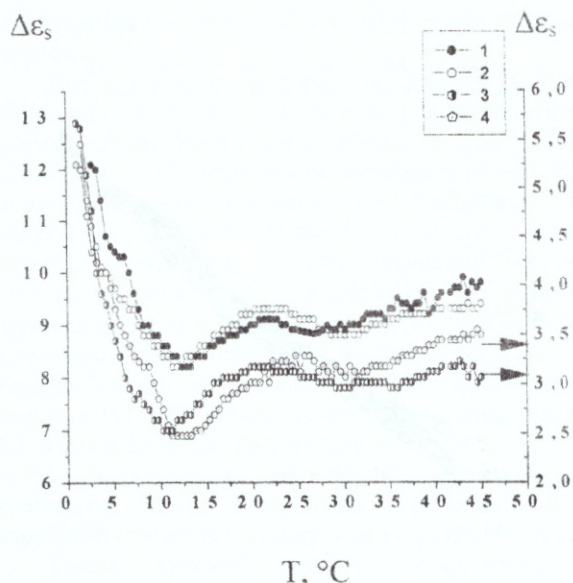


Рис.5. Температурная зависимость декремента статической диэлектрической проницаемости  $\Delta\epsilon_s$ : 1, 2 – суспензия эритроцитов доноров и онкологических больных (РГЖ, РЛ) относительно 0,15М NaCl (до лучевой терапии); 3, 4 – тени эритроцитов доноров и онкологических больных (РГЖ, РЛ) относительно 5мМ Na-фосфатного буфера (до лучевой терапии).

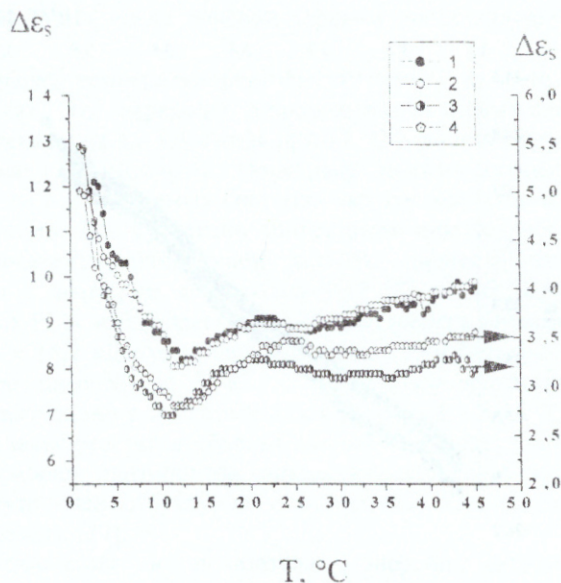


Рис.6. Температурная зависимость декремента статической диэлектрической проницаемости  $\Delta\epsilon_s$ : 1, 2 – суспензия эритроцитов доноров и онкологических больных (РГЖ, РЛ) относительно 0,15М NaCl (после лучевой терапии); 3, 4 – тени эритроцитов доноров и онкологических больных (РГЖ, РЛ) относительно 5мМ Na-фосфатного буфера (после лучевой терапии).

В температурном интервале 42-46 °С полученные результаты можно объяснить появлением (или увеличением числа) дефектов в липидном бислое мембраны в результате деформации клеток под влиянием опухоли и лучевой терапии.

Однонаправленный характер обнаруженных в ходе проведенного исследования нарушений температурной зависимости частоты диэлектрической релаксации суспензии эритроцитов и их теней у больных с различной локализацией опухолей до и после лучевой терапии позволяет рассматривать эти нарушения как неспецифические признаки вовлечения периферического звена эритрона в сложный комплекс изменений в организме, сопутствующих развитию опухолевого процесса. В связи с этим полученные в работе данные могут быть использованы как параметр, характеризующий факт изменения функционального состояния мембраны.

### ВЫВОДЫ

На Аррениусовой зависимости времени диэлектрической релаксации молекул воды в суспензии эритроцитов больных с злокачественными опухолями в области температуры 8 °С наблюдается излом с увеличением энергии активации от 15,4 до 22,3 кДж/моль. Гидратация мембран эритроцитов доноров и онкологических больных уменьшается в области температур от 2 до 15 °С и растет в интервале температур 18-32 °С.

После применения лучевой терапии степень гидратации мембран эритроцитов онкологических больных приближается к показателям доноров.

Наблюдаемые изменения в совокупности с изменениями структурных и функциональных свойств мембран эритроцитов могут рассматриваться как один из важных аспектов взаимоотношения организма и опухоли.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машевский А. А. Диагностика основных форм злокачественных опухолей по биохимическим и биофизическим характеристикам крови. Автореф. д. мед. наук. – Минск. 1994. – 36с.
2. Шиловцева А.С. О соотношении основных электролитов в динамике развития некоторых злокачественных новообразований. Автореф. д. мед. наук. – Куйбышев, 1971. – 32с.
3. Lang F., Busch G. L., Ritter M. // Physiological reviews. – 1998. – Vol. 78. № 1. – PP.132-145.

4. Yarbro J. W., Bornstein R. S. *Oncologic Emergencies*. – New York, 1981.
5. Поповская Т.Н. // Вестн. мор. мед. – Одесса, 2000. – С.70-75.
6. Бардычев М.С., Казалап С.Н. // Вопр. онкологии. – 1995. – Т.45, № 2. – С.99.
7. Hall E. J. *Radiobiology for the radiologist*. 4 Edition. – 1994. – 167 p.
8. Воробьев Е.И., Степанов Р.П. *Ионизирующее излучение и кровеносные сосуды*. М.: Энергоатомиздат, 1985. – 296 с.
9. Дворецкий А.И., Ананьева Т.В., Куликова И.А., Егорова Е.Г. и т.д. *Нейротрансмиттерная модуляция ионного гомеостаза в клетках головного мозга при радиационных воздействиях*. – Киев, 2001. – 167с.
10. Сорокина З. А. Состояние калия, натрия и воды в цитоплазме клеток. – Киев: Наук. думка, 1978. – 212с.
11. Антонченко В. Я. *Микроскопическая теория воды в порах мембран*. Киев.: Наук. думка, 1983. – 160с.
12. Morariu V.V., Benga Ch. // *Membrane Process*. – New York: E. A., 1984. – PP. 121-139.
13. Verbavatz J. M., Brown D., Sabolic I. // *Journal of Cell Biology*. – 1993. – 123(3):605. – P.18.
14. Dix J. A., Solomon A. K. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1984. – V.773, № 2. – PP.219-230.
15. Pliquet, U., Pliquet F. // *Phys. Chem. Biol. & Med.* – 1996. – № 2. – PP. 11-19.
16. Farrant J., Woolgar A. E. // *Ibid.* – 1972. – V.9, № 1. – PP. 9.
17. Моисеев В.А., Межидов С.Х., Надрид О.А. // *Биофизика*. – 1989. – Т.XXXIV, вып. 6. – С.993-996.
18. Болис Л. С., Хоффман Д. Ф., Лиф А. *Мембраны и болезнь*. – М.: Медицина, 1980. – 408с.
19. Берест В. П., Гаташ С. В., Николов О. Т. // *Вестник ХДУ*. – 1999. – № 434, вып. 3(1). – С. 92–95.
20. Щеголева Т. Ю., Бахова Л. К. // *Биофизика*. – 1985. – Т. XXX, вып. 4. – С.358-359.
21. Батюк Л. В., Гаташ С. В., Горобченко О. А., Николов О. Т. // *Вестник Харьковского университета*. – 2002, № 560, вып.1(10). – С. 54–57.
22. Николов О.Т., Жиякова Т. А. // *Журн. физ. хим.* – 1991. – Т. 65, № 5. – С.1312–1316.
23. Глестон С., Лейдер К., Эйринг Г. *Теория абсолютных скоростей реакций*. – М., ИИЛ. – 1948.
24. Жиякова Т. А., Николов О. Т., Малеев В. Я. // *Журн. физ. хим.* – 1993. – Т. 67, № 7. – С.1396-1400.
25. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M. // *J. Cell Biochem.* - 1984. - Vol.25 (2). - P.73-86.
26. Gordon L.M., Mobley P.W. // *J. Membr. Biol.* – 1984. - Vol.79 (1). - P.75-86.
27. Forte T., Leto T.L., Minetti M., Marches V.T. // *Biochemistry*.- 1985.- Vol.24(27).- P.7876- 7880.
28. Marcelja S., Wolfe J. // *BBA*. - 1979. - Vol.557, № 1. - P. 24-32.
29. Minetti N., Ceccarini M. // *J. Cell Biochem.* - 1982. - Vol.19, N1. - P.59-77.
30. Bennett V. // *Biochem. Biophys. Acta*. – 1989. – Vol. 988 (1). – P. 107-121.
31. Финан Дж., Колман Р., Митчелл Р. *Мембраны и их функции в клетке*. – 1977. – С.78-107.
32. Грех И.Ф., Зельдович Д.Р., Богнибов Е.А. // *Мед. радиол.* – 1964. – Т.9, N2 – С.52-56.
33. Баджиян С.А., Казарян П.А., Акопов С.Э., Саарян А.В. // *Рад. биол. радиоэкол.* – 1995. – Т.35, вып.3. – С.364–369.
34. Потульницкая Л.Н. Угнетение гемопоэза при лучевой терапии некоторых злокачественных новообразований и его восстановление путем аутомиелотрансплантации // *Поражение и восстановление кроветворения при острой лучевой болезни*. – М. 1990. – С.66.
35. Кавецкий Р.Е. *Диагностика и лечение злокачественных заболеваний*. – Изд-во: “Наукова думка”. – 1979. – 180с.
36. Киселева Е.С., *Лучевая терапия в комбинированном и комплексном // Комбинированное и комплексное лечение больных злокачественными опухолями*. – М. – 1989. – С.22–40.
37. Бала Ю. М., Белошевский В.А. // *Гематол. и трансфузиол.* – 1987. – Т.32, № 4. – С.32-38.
38. Гордон Д. *Органическая химия растворов электролитов*. – М.: Мир. – 1979. – 712с.
39. Черницкий Е. А., Воробей А. В. *Структура и функции эритроцитарных мембран*. Минск “Наука и техника”. – 1981. – 216 с.
40. Борисова А. Г., Олейник Е. К. // *Клинич. лаб. диагн.* – 2001. – № 5. – С. 14-16.
41. Журавлев А. К., Мурашко В. В. и др. // *Бюл. экспериментальной биологии и медицины*. – 1984. – Т.98, № 11. – С.596-598.
42. Забелинский С. А., Чеботарева М. А., Кривченко А. И. // *Журн. эволюц. биохим.* – 1996. – Т.32, № 6.– С.722-734.