

Е. В. Севериновская, Е. Ю. Зайченко, А. И. Дворецкий
Днепропетровский национальный университет

СИСТЕМЫ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ИОНОВ ПРИ РАДИАЦИОННО-ХИМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ НА ОРГАНИЗМ

Представлено результати експериментів з хронічного впливу іонів важких металів у дозі 2 ГДК і низькоінтенсивного опромінення в дозі 0,25 сГр як окремо, так і сумісно на трансмембранний переніс іонів K^+ у мембранах кори головного мозку щурів. Показано зниження пасивних та активних потоків іонів калію під впливом опромінення, що, видимо, пов'язано з порушенням транспортних функцій мембрани. При сумісному впливі суміші важких металів й опромінення спостерігається зростання пасивної проникності K^+ одночасно із зниженням активного мембранного транспорту, що може свідчити про вичерпання компенсаторних можливостей клітини на тлі структурно-функціональних порушень мембран.

Experimental data on chronic influence of ions of heavy metals in a dose of 2 EPC (extreme permissible concentrations) and of low-intensity irradiation in a dose of 0,25 Gr both separately, and jointly on transmembrane transport of K^+ ions through membranes of rat brain cortex are submitted. The decrease of passive and active flows of potassium ions under the effect of irradiation has been shown, that, probably, is connected to disturbance of membrane transport functions. Under the combined influence of a mixture of heavy metal salts and of irradiation increase of passive permeability of K^+ has been observed simultaneously with inhibition of active membranous transport, that can testify to exhaustion of compensatory capabilities of a cell on a background of structural-functional disturbances of a membrane.

Введение

Плазматическая мембрана выполняет многочисленные функции и оказывает регулирующее влияние на большинство внутриклеточных процессов [3–5]. Учитывая, что Na-K-насос играет определенную роль в процессах синаптической передачи нервного импульса, регуляция его активности, очевидно, имеет важное физиологическое значение. Согласно предположениям [1], механизм активации Na-K-АТФазы имеет следующий вид: взаимодействие норадреналина с α -адренорецептором \rightarrow конформационные перестройки в рецепторе \rightarrow передача сигнала за счет дальнего действия \rightarrow конформационные перестройки в молекуле Na-K-АТФазы \rightarrow уменьшение сродства к эндогенному Ca^{2+} \rightarrow активация фермента.

Процессы трансмембранного переноса ионов очень чувствительны к влиянию различных факторов физической и химической природы [4], в том числе антропогенным токсикантам – тяжелым металлам, пестицидам и другим классическим загрязнителям окружающей среды. В результате техногенного загрязнения основных источников питьевой воды химическими поллютантами (в том числе и ионами металлов) происходит повышение радиационно-химической нагрузки на население больших промышленных регионов, что может приводить к клиническим нарушениям в организме. Поэтому особенное значение имеет установление наиболее ранних функциональных изменений на молекулярно-клеточном уровне. В связи с этим изучение состояния наружной клеточной мембраны при воздействии экотоксичных факторов и, прежде всего, низкоинтенсивного хронического облучения и тяжелых металлов, учитывая реальную экологическую обстановку на территории промышленно развитых регионов Украины, приобретает первостепенное значение.

В связи с этим нашей целью было изучение отдельного и совместного влияния хронического рентгеновского облучения низкой интенсивности в дозе 25 сГр и смеси солей тяжелых металлов (Pb, Co, Cu, Zn, Cd) в концентрации по 2 ПДК для каждого металла на транспорт K^+ в срезах коры головного мозга крыс.

Эти эксперименты составляют часть исследований основных молекулярно-клеточных механизмов совместного хронического действия физических и химических факторов окружающей среды.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на белых крысах линии Вистар весом 160–200 г, которые находились на стандартном рационе вивария. Животных хронически облучали по 1 сГр в сутки (до достижения суммарной дозы 25 сГр) на установке РУМ-17.

Смесь металлов, состоящую из солей свинца, кобальта, меди, цинка и кадмия давали крысам с водой для питья в количестве по 2 ПДК для каждого металла.

После быстрой декапитации крыс на холоде готовили срезы коры головного мозга толщиной 0,3–0,4 мм и массой 10–12 г на микротоме МНТ-84 [2]. Время от декапитации до приготовления последнего среза составляло 10 ± 1 минут. Для инкубации использовали бикарбонатный буфер Кребса–Рингера, который уравнивали газовыми смесями $O_2:CO_2$ или $N_2:CO_2$ (в отношении 95%:5%) в зависимости от условий эксперимента.

Транспорт калия в срезах исследовали по схеме [8], преинкубация – 20 минут, анаэробная инкубация – 10 минут, аэробная инкубация – 30 минут. По способности срезов к противогradientной реаккумуляции калия из омывающего раствора, которая определялась как разность содержания калия в срезах после анаэробной и аэробной инкубации, оценивали активность Na,K -насоса. Содержание K^+ определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС-508 ("Hitachi", Япония) после предварительного растворения срезов в концентрированной азотной кислоте.

Полученные результаты обрабатывали статистически. Достоверные изменения между вариационными выборками определяли по критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Полученные экспериментальные данные (табл. 1) показали, что хроническое низкоинтенсивное облучение в дозе 25 сГр приводило к существенному достоверному снижению концентрации ионов калия в срезах мозга во все исследованные периоды, кроме анаэробной инкубации, что может быть связано с пониженным уровнем калия в исходных срезах.

Потребление лабораторными животными питьевой воды, загрязненной солями тяжелых металлов, также снижало уровень ионов K^+ как в исходных срезах коры головного мозга, так и после анаэробной и аэробной инкубации.

Комбинированное влияние облучения в низких дозах и смеси ионов тяжелых металлов приводило к существенному (на 37,72%) снижению уровня калия в исходных срезах ткани мозга крыс, тогда как под влиянием облучения – только на 19,09%, а смеси металлов – на 8,77%. Как известно, в ближайшие 5–10 минут после декапитации и извлечения мозга в тканях происходит распад АТФ и креатинфосфата, накопление продуктов утилизации, нарушаются энергозависимые процессы. Однако после 10–15 минут преинкубации, в последующие 30 минут уровень макроэргических фосфатов увеличивается практически до исходного [5]. В нашем случае во время последующих периодов инкубации уровень ионов K^+ в ткани продолжал снижаться. После анаэробной и аэробной инкубации

концентрация ионов калия снизилась на 36,51% и 37,6% соответственно по отношению к контролю, что говорит о серьезных нарушениях транспортных функций мембран клеток коры головного мозга, вызванных комбинированной радиационно-химической нагрузкой на организм.

Следует отметить, что уменьшение исходного уровня K^+ в тканях мозга, видимо, является результатом нарушения ионной проницаемости мембран и разбалансирования процессов пассивного и активного транспорта в мембранах нейронов под влиянием факторов радиационно-химической природы. Согласно полученным результатам, в срезах коры головного мозга, которые инкубировали *in vitro*, во всех случаях наблюдалось изменение (снижение в той или иной мере) содержания K^+ , которое обусловлено, возможно, аналогичными модификациями активности Na,K-насоса, выраженными в различной степени.

Таблица 1

Влияние радиационно-химических факторов на транспорт K^+ в срезах коры головного мозга крыс (мэв K^+ / мг влажного веса; $M \pm m$; $n=6 \div 10$)

Варианты исследований	Концентрация ионов калия			
	исходные срезы	Преинкубация	анаэробная инкубация	аэробная инкубация
Контроль	111,97±1,63	36,06±0,87	19,83±0,41	27,87±0,33
Облучение	90,60±0,70*	31,17±0,94*	19,07±0,33	24,56±0,58*
Смесь металлов	102,15±0,39*	47,43±1,09*	14,66±0,73*	22,1±0,59*
Облучение+ смесь металлов	69,74±1,48*®	32,47±0,8*	12,59±0,4*®	17,39±0,72*®

* – достоверно по отношению к контрольной величине,

® – достоверно по отношению к облучению, $p \leq 0,05$

Интересным явилось сопоставление уровня пассивного и активного транспорта ионов калия в клетках коры головного мозга крыс исследованных групп (рис. 1). При низкоинтенсивном хроническом облучении снижается диффузионный выход ионов калия из срезов, обусловленный, вероятно, более низким исходным уровнем K^+ в ткани мозга. Результат обратной закачки ионов калия за счет работы Na,K-насоса также оказывается достоверно сниженным. При влиянии смеси металлов, наоборот, наблюдается интенсивный пассивный выход ионов K^+ из срезов коры головного мозга, затем включаются компенсаторные механизмы, которые обеспечивают работу активного транспорта приблизительно на том же уровне, как и у контрольных животных. В случае сочетанного действия двух факторов интенсивность пассивного транспорта калия через мембраны нервных клеток увеличивается по сравнению с контролем и с влиянием хронического облучения в дозе 25 сГр, но остается существенно ниже по сравнению со смесью металлов, что говорит о разнонаправленных механизмах действия радиационных и химических факторов на пассивный транспорт ионов K^+ .

Интересные результаты наряду с изучением пассивных потоков дал анализ активного транспорта ионов K^+ , функцией которого в обычных условиях является поддержание определенного градиента ионов калия на плазматической мембране, нормализация ионного гомеостаза, стабилизация мембранного потенциала. Нами было установлено, что активный транспорт угнетен в срезах коры головного мозга крыс, подвергшихся влиянию хронического низкоинтенсивного облучения, а также комбинированного действия радиационно-химических факторов. Причем в последнем случае ингибирование активного мембранного транспорта ионов K^+ происходит на фоне возрастания пассивной калиевой проницаемости. Одной из

причин этого может быть сниженный уровень макроэргов (что характерно для облученной клетки [3; 4]), недостаточный для обеспечения энергозависимого активного транспорта ионов.

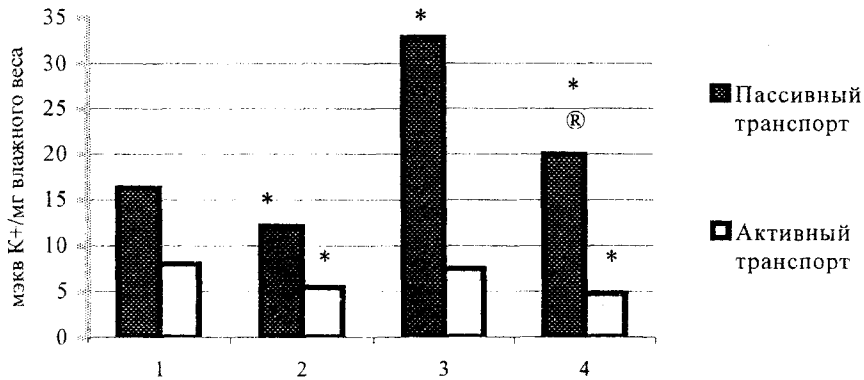


Рис. 1. Влияние радиационно-химических факторов на пассивный и активный транспорт ионов калия в срезах коры головного мозга крыс

Условные обозначения: группа 1 – контрольные животные; группа 2 – животные, подвергшиеся низкоинтенсивному хроническому облучению в дозе 25 сГр; группа 3 – животные, получавшие соли тяжёлых металлов с водой для питья; группа 4 – животные, подвергшиеся радиационно-химической нагрузке. * – достоверно по отношению к контрольной величине; ® – достоверно по отношению к облучению

Вместе с тем уровень противогradientного транспорта в срезах коры головного мозга крыс, которые находились под влиянием химической нагрузки, незначительно отличался от контроля.

Возможно, что избыточное количество тяжелых металлов на фоне низкоинтенсивного облучения в дозе 25 сГр может вызывать признаки отравления организма, которые сопровождаются снижением активности и биосинтеза некоторых ферментов, угнетением мембранных АТФаз. Это, возможно, является следствием накопления продуктов перекисного окисления липидов в тканях [6; 7], снижения энергетического потенциала клетки [3], что, в свою очередь, приводит к исчерпанию компенсаторных возможностей клетки и связано с глубокими структурно-функциональными перестройками мембран.

Выводы

Подводя итог следует отметить, что в целом нарушения систем активного транспорта и проницаемости клеточных мембран относятся к числу наиболее ранних эффектов при радиационно-химическом воздействии на организм.

Хроническое низкоинтенсивное облучение в дозе 25 сГр, с одной стороны, может вызывать нарушения физико-химических свойств мембраны, приводящие к снижению пассивной и активной проницаемости клеток и снижению возбудимых свойств мембран. С другой стороны, малые дозы радиации могут ингибировать транспортные функции мембран вследствие накопления в последних токсичных продуктов, в первую очередь, продуктов перекисного окисления липидов. Это может приводить к изменению конформационных характеристик и лабильности липопротеидных структур мембран [4].

При сочетанном влиянии смеси тяжелых металлов и облучения в нейроне запускаются в действие клеточные механизмы, направленные на возобновление

ионных градиентов на мембране, на сохранение ионного гомеостаза, но вследствие снижения энергетического уровня клетки активный транспорт калия из омывающего раствора, обусловленный работой Na, K-насоса, осуществляется со скоростью, значительно меньшей контрольной.

Вообще изучение совместного влияния на живые системы различных неблагоприятных факторов имеет особый интерес, так как, кроме того, что это отвечает условиям современной экологии, такое изучение может способствовать более четкому выявлению защитных компенсаторных механизмов клеток. С другой стороны, сопоставление и анализ данных помогают выяснить механизм воздействия этих факторов на живые системы.

Таким образом, влияние токсических веществ и низкоинтенсивного хронического облучения на противогradientный калиевый транспорт в конечном итоге может приводить к изменению электрических свойств мембраны и функционального состояния ЦНС.

Библиографические ссылки

1. Аксентев С. Л. Исследование механизма активации Na,K-АТФазы мозга норадреналином / С. Л. Аксентев, С. В. Конев, Т. И. Лыскова и др. // Биохимия. – 1978. – Т. 43, вып. 10. – С. 1893–1899.
2. Буданцев А. Ю. Микротом МНТ-84 – срезы нативной ткани – прижизненные исследования на молекулярно-клеточном уровне. – Пушино, 1985.
3. Дворецкий А. И. Трансмембранный перенос ионов при действии ионизирующей радиации на организм / А. И. Дворецкий, С. Н. Айрапетян, А. М. Шаинская, Е. Е. Чеботарев. – К.: Наукова думка, 1990.
4. Дворецкий А. И. Клеточные мембраны при радиационном воздействии / А. И. Дворецкий, В. А. Барабой, Д. Кетелеш и др. – Днепропетровск: ДДУ, 1998.
5. Дворецкий А. И. Нейротрансмисмиттерная модуляция ионного гомеостаза в клетках головного мозга крыс при радиационных воздействиях / А. И. Дворецкий, Т. В. Ананьева, И. А. Куликова и др. – К., 2002.
6. Дворецкий А. И. Биологические эффекты комбинированного воздействия низкодозового облучения и ионов тяжелых металлов / А. И. Дворецкий, Т. В. Ананьева, Е. А. Лихолат // Радиобиология. Радиозэкология. – 2000. – Т. 40, № 4. – С. 410–415.
7. Дворецкий А. И. Комбинированные воздействия внешнего облучения в малой дозе и загрязнителей питьевой воды на прооксидантные и антиоксидантные процессы в организме / А. И. Дворецкий, Е. Г. Егорова, Е. Ю. Зайченко, Е. В. Севериновская // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Серія Біологія. – Днепропетровск: ДНУ, 2002. – Вип. 10. – С. 174–180.
8. Israel J. Effects of Lower Alcohols on Potassium Transport and Microsomal Adenosine-Triphosphatase Activity of Rat Cerebral Cortex / J. Israel, H. Kalant, A. E. Le Blanc // Biochem. J. – 1966. – Vol. 100. – P. 27–33.

Надійшла до редколегії 20.03.05