

Р.І. Кратенко,  
А.Б. Мітряєв

Харківський державний  
медичний університет

## Дія іонізуючого випромінювання та 12-краун-4 на фосфоліпідний склад еритроцитів і гепатоцитів білих щурів

### The effect of ionizing radiation and 12-crown-4 on phospholipid composition of erythrocytes and hepatocytes in white rats

**Цель работы:** Сравнение действия 12-краун-4 и ионизирующего излучения на фосфолипидный состав мембран эритроцитов и гепатоцитов белых крыс в условиях подострого эксперимента.

**Материалы и методы:** Первой опытной группе животных в течение 15 дней ежедневно с помощью зонда вводили водную эмульсию 12-краун-4 в 1/1000 ДЛ<sub>50</sub>. Вторая опытная группа ежедневно круглосуточно (в течение того же срока) подвергалась хроническому общему облучению, генерируемому с помощью установки «Эксперимент» (Россия, источник  $\gamma$ -излучения – <sup>60</sup>Co). Для анализа фосфолипидного состава использовали эритроциты, отмые от плазмы раствором хлористого натрия при 3–4-кратном центрифугировании. Количественное содержание общих и индивидуальных фосфолипидов в липидных экстрактах оценивали по количеству неорганического фосфора, которое определяли с помощью молибденового реагента с последующим колориметрированием. Отношения фосфолипидных фракций рассчитывали в процентах фосфора фосфолипидов каждой фракции к сумме фосфора всех фосфолипидов, принятой за 100 %.

**Результаты:** В гепатоцитах оба фактора повышали процент фосфатидилхолинов и кардиолипинов (достоверно только для 12-краун-4), снижая при этом процент фосфатидилинозитолов (достоверно только для 12-краун-4) и сфингомиелинов. Процентные соотношения фосфатидилсеринов и фосфатидилэтаноламинов не изменялись. Статистически достоверно увеличивались лизоформы фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов в гепатоцитах и эритроцитах крыс обеих экспериментальных групп, что по-видимому, является следствием активации свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов.

**Выводы:** Действие ионизирующей радиации и 12-краун-4 значительно влияет на фосфолипидный состав мембран гепатоцитов и эритроцитов, изменяя соотношение фракций и повышая процентное содержание лизоформ фосфолипидов. Практически идентичный характер изменений под влиянием ионизирующей радиации и 12-краун-4 указывает на наличие у последнего радиомиметических свойств.

**Ключевые слова:** ионизирующее излучение, краун-эфир, фосфолипиды, биологические мембраны, гепатоциты, эритроциты.

**Objective:** To compare the effect of 12-crown-4 and ionizing radiation on phospholipid composition of erythrocyte and hepatocyte membranes of white rats in subacute experiment.

**Material and Methods:** Group 1 of experimental animals were administered water emulsion of 12-crown-4 1/1000 LD<sub>50</sub> for 15 days. Group 2 of experimental animal were exposed to chronic total irradiation generated with Experiment unit (Russia) with Co-60 source. To analyze phospholipid composition, erythrocytes separated from plasma with sodium chloride solution at 3–4 fold centrifuging were used. The amount of total and individual phospholipids in lipid extractions was evaluated according to the amount of non-organic phosphorus, which was determined with molybdenum reagent and colorimetry. The ratio of phospholipid fraction was calculated as percentage of phospholipid phosphorus of each fraction to the sum of phosphorus of all phospholipid taken as 100%.

**Results:** In hepatocyte, the both factors increased the amount of phosphatidyl cholines and cardiolipins (significantly only for 12-crown-4), reducing the percentage of phosphatidyl inositols (significantly only for 12-crown-4) and sphingomyelins. The percentage of phosphatidyl serins and phosphatidyl ethanolamines did not change. Lysoforms of phosphatidyl ethanolamines and phosphatidyl cholines in hepatocytes and erythrocytes of the rats of both experimental animals increased significantly, which could be the consequence of free-radical processes activation and lipid peroxidation.

**Conclusion:** The effect of ionizing radiation and 12-crown-4 influences considerably phospholipid composition of erythrocyte and hepatocyte membranes, changing the ratio of the fractions and elevating the percentage of phospholipid lysoforms. Similar character of the changes caused by ionizing radiation and 12-crown-4 suggests the presence of radiomimetic properties in the latter.

**Key words:** ionizing radiation, crown-ethers, phospholipids, biological membranes, hepatocytes, erythrocytes.

В останні роки фармакологія і біофізика макроциклічних поліефірних комплексонів привертають увагу дослідників. За хемічною будовою вони являють собою макроциклічні вуглеводневі сполуки з атомами кисню, вклю-

ченими в кільце [1]. Краун-ефіри досить широко застосовують у екстракції, розподілі йонів металів, міжфазному каталізі, електрохемії, моделюванні біохемічних реакцій, тонкому органічному синтезі, медицині, агрономії,

металургії [1, 2]. Широке використання макроциклічних ефірів зумовлене їхньою здатністю розчинятися в багатьох неводних розчинниках, ліпофільністю, здатністю утворювати координаційні зв'язки з іонами лужних металів, а також сполуки з високою електропровідністю і взаємодіяти з хіральними атомами [2, 3]. Однак ці властивості, корисні в промисловості, можуть стати причиною високої біологічної активності й токсичної дії краун-ефірів при надходженні їх з водою до організму людини і теплокровних тварин.

Раніше нами було показано, що в процесі гідролітичної й термічної деструкції у воді та біологічної трансформації в організмі гетероциклічні кільця краун-ефірів розпадаються, даючи початок широкому спектру біологічно активних низькомолекулярних сполук, більшість з яких набагато токсичніші, ніж їх попередники [4, 5]. Деякі з метаболітів краун-ефірів мають радіоімітичні властивості, тобто здатні імітувати радіобіологічні ефекти. Це такі речовини, як формальдегід, масляний, оцтовий, пропіоновий, гліцериновий, кротоновий альдегід, малоновий діальдегід, ацетон, спирт та ін. [6]. Крім того, самі краун-ефіри, які є досить ліпофільними і надзвичайно кумулятивними сполуками [5], що мають комплексотворювальні, йонофорні та мембранотропні властивості [1-3], цілком можуть виступати як радіоімітери.

Тому метою нашої роботи стало порівняння впливу 12-краун-4 як характерного й найбільш біологічно активного представника краун-ефірів [3, 5] та йонізуючого випромінювання на фосфоліпідний склад мембран еритроцитів і гепатоцитів білих щурів в умовах підгострого експерименту, виконаного згідно з «Методическими указаниями по проведению и научному обоснованию ПДК вредных веществ» [7].

#### Методика дослідження

Білих щурів (маса 180-210 г), використаних в експерименті, утримували в стандартних умовах виварію. Першій дослідній групі тварин протягом 15 днів щодня

вводили за допомогою зонду водяну емульсію 12-краун-4 у 1/1000 ДЛ<sub>50</sub> (1,79 мг/кг). Другу дослідну групу щодня цілодобово (протягом того ж терміну) піддавали хронічному загальному опромінюванню, яке генерувалося за допомогою установки «Експеримент» (Росія, джерело  $\gamma$ -випромінювання – <sup>60</sup>Co). Дозиметричний контроль проводили клінічним дозиметром типу 27012 (Veb RFT Messelektronik «Otto Schon», Німеччина) з дозиметричною камерою Va-K-254 (Veb RFT Messelektronik «Otto Schon»). Довірчі похибки визначали безпосередньо в кожній клітці, куди на час опромінювання вміщували щурів. Експозиційна доза в прямому пучку становила 5,5 ± 0,3 мГр/год; у зоні опромінювання, що прилягає до прямого пучка, – 0,05 ± 0,003 мГр/год; сумарна поглинена доза – 1,8-1,9 Гр.

По закінченню експерименту тварин декапітували гільйотинним ножом, попередньо анестезуючи натрію тіопенталом (50 мг/кг в/б) [8], і досліджували фосфоліпідний склад гепатоцитів печінки й еритроцитів крові. Для аналізу фосфоліпідного складу використовували еритроцити, відмиті від плазми розчином хлористого натрію при 3-4-разовому центрифугуванні. Для дослідження мембран гепатоцитів печінки гомогенізували в скляному гомогенізаторі Поттера. Мембрани виділяли загальноприйнятими методами за рекомендаціями [9]. Екстракцію ліпідів проводили методом Кейтса [10] та випарювали їх у струмі сухого азоту. Для розподілу індивідуальних фосфоліпідів на фракції використовували двовимірну мікротонкошарову хроматографію [11]. Ідентифікацію фосфоліпідів проводили за стандартними розчинами фосфоліпідів і за допомогою специфічних реакцій на ліпіди [12]. Кількісний вміст загальних та індивідуальних фосфоліпідів у ліпідних екстрактах оцінювали за кількістю неорганічного фосфору, визначеною за молібденовим реагентом з наступним колориметруванням. За стандарт правив розчин двоамішеного калію фосфату. Колориметрування проводили при довжині хвилі 815 нм. Відношення фосфоліпідних фракцій розраховували у відсотках фосфору фосфоліпідів кожної фракції до суми фосфору усіх фосфоліпідів, прийнятого за 100%. Для оцінки фосфоліпідного складу еритроцитів визначали фосфатидилхолін (ФХ), сфінгомелін (СМ), фосфатидилсерин (ФС), лізофосфатидилхолін (ЛФХ) і фосфатидилетаноламін (ФЕА). У печінці додатково вивчали лізофосфатидилетаноламін (ЛФЕА), фосфатидилінозитол (ФІ), фосфатидну кислоту (ФК) і кардіоліпін (КЛ).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм STATGRAPHIC з використанням ПК.

#### Результати та їх обговорення

Результати експериментів (табл. 1, 2) свідчать про те, що як дія іонізуючої радіації, так і вплив 12-краун-4 істотно змінюють співвідношення фосфоліпідних фракцій мембран еритроцитів і гепатоцитів білих щурів. При цьому спрямованість змін в основному однакова.

Зокрема, у гепатоцитах обидва фактори підвищували відсоток ФХ і КЛ (вірогідно тільки для 12-краун-4), знижуючи при цьому відсоток ФІ (вірогідно тільки для 12-краун-4) і СМ. Відсоткові співвідношення ФС

Таблиця 1 – Вплив іонізуючої радіації та 12-краун-4 на фосфоліпідний склад мембран гепатоцитів  
 The influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on the phospholipid composition of hepatocyte membranes

Речовина	Показник, %							
	ФЕА	ФХ	СМ	ФС	ЛФЕА	ЛФХ	ФІ	КЛ
Контроль	23,3±2,1	39,4±3,2	16,0±0,7	9,0±0,8	1,3±0,4	1,2±0,5	7,7±0,6	0,8±0,07
12-краун-4	25,4±2,3	50,1±2,5*	12,1±0,9*	8,4±0,7	2,4±0,09*	4,9±1,1*	5,4±0,5*	2,5±0,18*
Опромінювання	21,2±1,4	53,1±1,4*	10,4±0,6*	10,3±0,9	2,7±0,06*	3,1±0,4*	7,6±0,7	1,1±0,33*

Примітка. Тут і далі: \* – розбіжності вірогідні порівняно з контролем  $p < 0,05$ , кількість тварин – 7.

Таблиця 2 – Вплив іонізуючої радіації та 12-краун-4 на фосфоліпідний склад мембран еритроцитів  
 The influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on the phospholipid composition of erythrocyte membranes

Речовина	Показник, %				
	ФЕА	ФХ	СМ	ФС	ЛФХ
12-краун-4	14,8±1,9	60,4±3,1*	10,4±1,6	10,3±1,1	5,7±0,4*
Опромінювання	15,3±1,5	61,7±2,0*	11,7±1,3	12,4±1,3	5,3±0,7*
Контроль	15,5±1,4	46,2±1,7	12,8±0,8	11,3±0,9	3,5±0,6

і ФЕА залишалися без змін. Слід зазначити статистично вірогідне збільшення лізоформ ФЕА і ФХ у гепатоцитах і еритроцитах щурів обох експериментальних груп.

Підвищення відсоткового вмісту лізоформ фосфоліпідів під впливом досліджуваного ксенобіотика й іонізуючого випромінювання можна пояснити посиленням перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Про це свідчать отримані дані про накопичення дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду (МДА) в печінці й сироватці крові, посилення біохемілюмінесценції крові, зниження вмісту відновленого глутатіону і зміни активності ферментів прооксидантного захисту в щурів, інтоксикованих різними представниками краун-ефірів [5], і тварин, що зазнали впливу іонізуючого опромінення [6]. Причиною посилення ПОЛ є підвищена генерація активних форм кисню монооксигеназною системою мікросом і утворення продуктів біотрансформації детергентів (альдегідів, кетонів, спиртів), яким притаманні прооксидантні ефекти. При впливі іонізуючої радіації альдегіди, кетоний спирти утворюються з ендогенних субстратів (жирних кислот фосфоліпідів мембран, амінокислот білків і т. ін.) [6].

Незважаючи на підвищений відсоток лізоформ, відсоток ФЕА не змінився, а ФХ навіть зріс, шр, ймовірно, пов'язано зі збільшенням швидкості обміну зазначених фракцій фосфоліпідів у мембранах еритроцитів і гепатоцитів щурів обох експериментальних груп. Відмінність впливу іонізуючої радіації і 12-краун-4 на вміст ФС і СМ у мембранах печінки еритроцитів, можливо, пов'язана з особливою роллю печінки в обміні як ліпідів узагалі, так і фосфоліпідів зокрема. Біосинтез фосфоліпідів у печінці необхідний не тільки для забезпечення відновлення і пристосування структурних фосфоліпідів у мембранних утвореннях самої печінки, але й для одержання тих з них, які транспортують ліпопротеїни плазми до інших тканин.

Оскільки КЛ є основними ліпідними компонентами мембран мітохондрій, зміна їхніх концентрацій, а внаслідок цього й ліпідного оточення ферментів мітохондріальних мембран, може бути однією з причин порушення біоенергетики, про що свідчать результати зниження активності сукцинатдегідрогенази, моноаміноксидази й АТФаз печінки [5]. Однак у разі впливу іонізуючого випромінювання спостерігається лише тенденція до підвищення відсотка КЛ у печінці.

---

Зниження в ній вмісту ФІ під впливом 12-краун-4, можливо, з одного боку, є наслідком активації вільнорадикальних процесів, а з іншого — однією з причин підвищеного утворення простагландинів, про що свідчать результати експериментів [5].

---

### Висновки

---

1. Дія іонізуючої радіації та 12-краун-4 значною мірою впливає на фосфоліпідний склад мембран гепатоцитів та еритроцитів, змінюючи співвідношення фракцій і підвищуючи відсотковий вміст лізоформ фосфоліпідів.

2. Практично ідентичний характер змін фосфоліпідного складу мембран під впливом іонізуючої радіації й 12-краун-4 вказує на наявність у останнього радіоміметичних властивостей.

### Література

1. Максютин Н. П., Ветютнева П. А., Назаренко А. Ю., Митченко Ф. А. // Фармацевт. журн. — 1991. — № 3. — С. 67-74.
2. Яцимирский К. Б., Ламнека Я. Д. Физикохимия комплексов металлов с макроциклическими лигандами. — К.: Наук. думка, 1985. — 256 с.
3. Хираока М. Краун-соединения, свойства и применение. — М.: Мир, 1986. — 277 с.
4. Кратенко Р. И. // Гиг. насел. мест. — 2001. — Т. 2, вып. 38. — С. 211-216.
5. Кратенко Р. И. Биологическая активность краун-эфиров в связи с проблемой охраны водных объектов. — Харьков: ХГМУ, 2001. — 207 с.
6. Кузин А. М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. — М.: Наука, 1986. — 256 с.
7. Методические указания по разработке и научному обоснованию ПДК вредных веществ. — №1296-75. — М., 1975.
8. Ланг С. М., Уилсон Р. П. // Лаборат. животные. — 1993. — Т. 3. — № 2. — С. 101-100.
9. Биологические мембраны / Под ред. Дж. Финдлея и У. Эванса. — М.: Мир, 1990. — 400 с.
10. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
11. Vaskovsky V. E., Terekkive T. A. // Jour. of High Res. Chromatogr. — 1979. — Vol. 2, № 11. — P. 671-672.
12. Методы биохимических исследований, липидный и энергетический обмен / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: ЛГМУ, 1982. — 272 с.

Дата надходження: 02.04.2002.

Дата остаточного надходження: 20.05.2002.

Адреса для листування:  
Кратенко Роман Іванович,  
кафедра біохімії ХДМУ, пр-т Леніна, 4, Харків,  
61022, Україна