

Р.І. Кратенко

Харківський державний
медичний університет

Вплив іонізуючого випромінювання та 12-краун-4 на компоненти згортальної системи крові щурів

Influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on coagulation system components of rat blood

Цель работы: Изучение влияния 12-краун-4 и ионизирующей радиации на некоторые компоненты системы свертывания крови: содержание Ca^{2+} и концентрацию простагландинов в сыворотке и содержание эритроцитов в плазме крови.

Материалы и методы: Содержание кальция в сыворотке крови определяли атомно-абсорбционным методом, а простагландинов — радиоиммунологическим методом: PgE_2 — с помощью диагностического набора изотопов АН ВНР (PgE_2 - 3H для радиоиммунологического анализа $PgF_2\alpha$); PgE_1 и E_2 — с использованием набора реактивов фирмы Advanced Magnetics inc. (USA). Количество эритроцитов определяли общепринятыми методами.

Результаты: Как 12-краун-4, так и ионизирующее излучение больше чем на 100 % повышали содержание PgE_2 , но уменьшали концентрацию PgE_1 (в среднем на 27 %) и $PgF_2\alpha$. Действие 12-краун-4 приводило к достоверному увеличению концентрации Ca^{2+} в плазме крови крыс, что, наиболее вероятно, объясняется способностью краун-эфира связывать ионы этого металла в клетках и его липофильными свойствами, благодаря которым этот комплекс свободно пересекает плазматические мембраны и поступает в плазму. На содержание эритроцитов в плазме крови 12-краун-4 не влиял. У крыс, подверженных действию ионизирующей радиации, концентрация Ca^{2+} в плазме оставалась без изменений, однако содержание эритроцитов несколько повышалось благодаря появлению незрелых форм; 12-краун-4 и ионизирующее излучение повышают коагулянтные возможности эритроцитов и изменяют профиль содержания простагландинов в направлении способствования агрегации тромбоцитов.

Выводы: Влияние 12-краун-4 и ионизирующего излучения повышает коагулянтные возможности эритроцитов, однако нужно констатировать наличие разных механизмов, приводящих к идентичному эффекту. Синергичность влияния ионизирующего излучения и 12-краун-4 на показатели процесса коагуляции крови указывает на наличие радиомиметических свойств последнего.

Ключевые слова: краун-эфиры, ионизирующее излучение, простагландины, эритроциты, ионы кальция.

Objective: To investigate the influence of 12-crown-4 and ionizing radiation on some components of blood coagulation system: Ca^{2+} contents and prostaglandin concentrations in the blood serum, and erythrocyte contents in the blood plasma.

Material and Methods: Ca^{2+} content was determined using atom-absorption method. Prostaglandin concentrations were investigated using radioimmunologic method: $PgF_2\alpha$ — with the aid of diagnostic isotope kit АН ВНР ($PgF_2\alpha$ - 3H for radioimmunologic analysis of $PgF_2\alpha$); PgE_1 and E_2 — with the use of reagent kit of Advanced Magnetics Inc. (USA). The erythrocyte quantity determination was performed by the generally accepted methods.

Results: 12-crown-4 as well as ionizing radiation increased PgE_2 contents by more than 100 %, but diminished PgE_1 and $PgF_2\alpha$ concentration (on an average by 27 %). 12-crown-4 action resulted in reliable increase in Ca^{2+} concentration of rat blood plasma which is probably explained by the crown-ether capacity of binding metal ions intracellularly and its lipophilic properties, owing to which this complex freely passes the plasmatic membranes and reaches the blood plasma. 12-crown-4 did not influence the blood plasma erythrocyte content. In the organism of rats exposed to ionizing radiation the plasma Ca^{2+} concentration remained without alterations, however, the erythrocyte contents somewhat increased due to the emergence of immature forms. 12-crown-4 and ionizing radiation induced coagulation properties of erythrocytes and altered the profile of prostaglandin contents in direction of thrombocyte aggregation facilitation.

Conclusions: The influence of 12-crown-4 and ionizing radiation increases the coagulation properties of erythrocytes, however, one must accept the occurrence of different mechanisms which result in the appearance of identical effects. The synergism of ionizing radiation and 12-crown-4 influence blood coagulation process points out at the occurrence of radiomimetic properties of the latter.

Key words: crown-ethers, ionizing radiation, prostaglandins, erythrocytes, calcium ions.

Такі макроциклічні сполуки, як краун-ефіри досить широко використовують у різних галузях промисловості (металургії, електрохімії, каталізі, тонкому органічному синтезі) при розв'язанні прикладних задач [1], а також у фармацевтичному аналізі, практичній та експериментальній медицині як протектори та пролонгатори лікарських препаратів [2].

Найбільш важливими властивостями краун-

ефірів є їх здатність утворювати стійкі комплекси із солями лужних та інших металів, включаючи у свою порожнину катіон, та ліпофільність їх молекул, і тому здатність розчинятися у багатьох неводних розчинниках та штучних і біологічних ліпідних мембранах [1, 2].

За умов хронічного надходження краун-ефірів до організму теплокровних тварин та людини, у процесі біологічної трансформації,

гетероциклічні кільця цих речовин розпадаються, даючи початок широкому спектру біологічно активних низькомолекулярних сполук, таких як формальдегід, масляний, оцтовий, пропіоновий, гліцериновий, кротоновий альдегіди, малоновий діальдегід, ацетон, спирти та інші [3, 4]. Цим речовинам притаманні радіоміметичні властивості, тобто вони здатні імітувати радіобіологічні ефекти [5]. З огляду на ліпофільність, комплексоутворюючі й іонофорні властивості краун-ефірів, а також беручи до уваги добре вивчені мембранотропні властивості речовин, ідентичних тим, що виникають при деструкції і біотрансформації цих комплексонів, варто було б очікувати у сполук даної групи радіоміметичного ефекту.

Це припущення підтвердилося у наших попередніх повідомленнях про синергічний вплив 12-краун-4 та йонізувального випромінювання на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), активність антиоксидантної системи, фосфоліпідний склад мембран [6, 7].

Все вищезгадане зумовлює актуальність досліджень, спрямованих на подальше вивчення радіоміметичних ефектів даного класу ксенобіотиків та їх впливу на процеси гемостазу і, насамперед, на фізико-хімічні властивості і хімічний склад крові.

Отримані нами результати свідчать про посилення процесів ПОЛ під впливом 12-краун-4 та йонізувального випромінювання, що супроводжується накопиченням дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду [6]. Є дані літератури, згідно з якими посилення вільнорадикальних процесів приводить до змін у системі коагуляції крові [8].

У зв'язку з цим метою роботи було вивчення впливу 12-краун-4, характерного представника макроциклічних краун-ефірів, та йонізувальної радіації на деякі компоненти згортальної системи крові. Зокрема, у крові було досліджено рівень Ca^{2+} (IV фактора згортальної системи), що відіграє важливу роль майже на всіх етапах коагуляції [9]; концентрацію простагландинів, які справляють прокоагулянтну дію, впливаючи на стадію агрегації тромбоцитів [10]; вміст еритроцитів, що беруть участь в утворенні червоних тромбів [11].

Методика дослідження

Білі щури (маса 180–210 г), використані в експерименті, утримувалися у стандартних умовах віварію. Першій дослідній групі тварин протягом 15 днів щодня за допомогою зонду вводили водяну емульсію 12-краун-4 у 1/1000 ДЛ₅₀ (1,79 мг/кг). Другу дослідну групу тварин щодня цілодобово (протягом того ж терміну) піддавали хронічному загальному опромінюванню, що генерувалося за допомогою установки «Експеримент» (Росія, джерело γ -випромінювання — ^{60}Co). Сумарна поглинута доза дорівнювала 1,8–1,9 Гр.

Дозиметричний контроль проводили клінічним дозиметром типу VA-J-18-N-830 з дозиметричною камерою VA-K-253 (Veb RFT Messelektronik Otto Schon). Довірчі похибки визначали безпосередньо в кожній клітці, де під час опромінювання утримувалися щури. Потужність дози вимірювали у центрі парафінового фантома, що імітував щура, який розміщували у 10 різних точках клітки.

Потужність поглинутої дози в прямому пучку складала $5,5 \pm 0,3$ мГр/год; у зоні опромінювання, прилеглої до прямого пучка — $0,05 \pm 0,003$ мГр/год.

По закінченні експерименту тварин того ж дня декапітували гільйотинним ножем попередньо анестезуючи натрію тіопенталом (50 мг/кг в/п) [12], і проводили дослідження крові.

Вміст кальцію у її сироватці визначали атомно-абсорбційним методом [13]. Вміст простагландинів (P_g) досліджували радіоімунологічним методом: P_gE_α — за допомогою діагностичного набору ізотопів АН ВНР (P_gF_α-³H для радіоімунологічного аналізу P_gF_α); P_gE₁ та E₂ — з використанням набору реактивів фірми Advanced Magnetics Inc. (USA). Кількість еритроцитів визначали загальноприйнятими методами (камера Горяєва).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за методом Стьюдента [14].

Результати та їх обговорення

Згідно з отриманими результатами, дія 12-краун-4 та йонізувального випромінювання виявила деяку специфічність відносно впливу на досліджувані параметри. Ефекти цих чинників на вміст метаболітів арахідонової кислоти у крові були односпрямованими, але їх вплив на інші параметри істотно відрізнявся.

Як 12-краун-4, так і йонізувальне випромінювання більш ніж на 100 % підвищували вміст P_gE₂, але зменшували концентрацію P_gE₁ (у середньому на 27 %) та P_gF_{2α} (табл. 1).

Як відомо, простагландини P_gE₁, P_gE₂ та P_gF_{2α} підвищують проникність капілярів [10]. Сумарний відсоток зниження вмісту P_gE₁ та P_gF_{2α} був меншим порівняно зі зростанням концентрації P_gE₂, тому отримані дані свідчать про можливе зростання проникності капілярів під впливом 12-краун-4 та йонізувальної радіації. Простагландин E₁ — сильний інгібітор

Вплив іонізуючого випромінювання та 12-краун-4 на вміст простагландинів у сироватці крові, нмоль/мл
Influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on the blood serum prostaglandin content, nmol/ml

Чинник	PGE _{2α}	PGE _{1α}	PGF _{2α}
Контроль	1362,9 ± 126,9	6823,17 ± 248,20	15,40 ± 1,14
Іонізувальне випромінювання	2748,7 ± 122,9*	5048,8 ± 318,5*	11,29 ± 1,46*
12-краун-4	3562,3 ± 269,3*	4958,3 ± 373,1*	10,45 ± 0,39*

Примітка. Тут і далі: * — розбіжності вірогідні, порівняно з контролем, $p < 0,05$, кількість тварин у кожній групі — 7.

агрегації тромбоцитів, а P_gE₂ підвищує їх адгезійні властивості [10]. Зниження концентрації P_gE₁ та зростання вмісту P_gE₂ сприятиме процесу згортання крові.

Зазвичай вважають, що роль еритроцитів у згортанні крові обмежується їх пасивною участю у формуванні тромбу, однак огляд літературних даних свідчить про активну роль червоних кров'яних клітин у нормальному та патологічному гемостазі [8, 11].

Важливу роль у реалізації прокоагулянтних властивостей еритроцитів відіграє фосфатидилсерин [8], а саме: його розміщення на зовнішній мембрані еритроцитів. Згідно з літературними даними, інкубація еритроцитів з Ca²⁺ та кальцієвим іонофором викликала зміни у нормальній асиметрії фосфоліпідів та підвищення прокоагулянтних властивостей еритроцитів [11]. Крім того, Ca²⁺ є важливим фактором згортання крові, що бере участь майже в усіх етапах утворення фібрину-полімеру [9].

У зв'язку з цим зростання вмісту Ca²⁺ у плазмі крові щурів під впливом ліпофільної речовини, здатної зв'язувати іони бівалентних металів та, завдяки ліпофільності, транспортувати їх у плазму, сприятиме зростанню активності згортальної системи крові.

Дані нашого експерименту підтвердили це припущення щодо 12-краун-4. Дія цієї сполуки призводила до вірогідного підвищення концентрації Ca²⁺ у плазмі крові щурів (див. табл. 1), що, найбільш імовірно, пояснюється здатністю краун-ефіру зв'язувати іони цього металу [1, 2] у клітинах та його ліпофільними властивостями [2], завдяки яким цей комплексон вільно перетинає плазматичні мембрани і надходить до плазми [4].

До речі, у дозі 1/1000 ДЛ₅₀ 12-краун-4 не впливав на вміст еритроцитів у плазмі крові (табл. 2).

Вплив іонізуючого випромінювання та 12-краун-4 на вміст еритроцитів у плазмі та іонів Ca²⁺ у сироватці крові
Influence of ionizing radiation and 12-crown-4 on erythrocyte content in the plasma and blood serum Ca²⁺ ions

Чинник	Вміст еритроцитів, 10 ¹² /л	Концентрація Ca ²⁺ , мг/мл плазми
Контроль	4,70 ± 0,25	3,10 ± 0,17
Іонізувальне випромінювання	5,60 ± 0,23*	3,00 ± 0,26
12-краун-4	4,60 ± 0,42	5,80 ± 0,27*

У попередніх дослідженнях стосовно фосфоліпідного складу клітин щурів, ми повідомляли, що дія 12-краун-4 (1/1000 ДЛ₅₀) не призводила до змін вмісту фосфатидилсерину у мембранах еритроцитів, але спостерігалася тенденція до підвищення відсоткового вмісту даної фракції фосфоліпідів під впливом іонізуючого випромінювання, і було зафіксовано вірогідне підвищення абсолютної величини цього показника, порівняно з контролем [7].

У щурів, підданих дії іонізуючої радіації, концентрація Ca²⁺ у плазмі не змінювалася, проте вміст еритроцитів у цих тварин дещо підвищувався, завдяки появі незрілих форм. У зв'язку з цим підвищення вмісту фосфатидилсерину в еритроцитарних мембранах та кількості еритроцитів у опромінених щурів, на фоні незмінної концентрації Ca²⁺ сприятиме активізації участі еритроцитів у процесі коагуляції.

У тварин, токсикованих 12-краун-4, роль еритроцитів у згортанні крові також підсилюється, але механізм цього підсилення трохи інший і відповідає молекулярній структурі цього специфічного чинника: відбувається підвищення концентрації Ca²⁺ на фоні відсутності змін вмісту фосфатидилсерину та еритроцитів.

Таким чином, аналіз отриманих результатів свідчить про те, що 12-краун-4 та йонізувальне випромінення підвищують коагулянтні можливості еритроцитів і змінюють профіль вмісту простагландинів у напрямку, що сприяє агрегації тромбоцитів. Подібність впливу 12-краун-4 та йонізувального випромінення на показники процесу коагуляції крові підтвержує радіоміметичні властивості цього ксенобіотика.

Висновки

1. Дія 12-краун-4 та йонізувального випромінення призводить до змін профілю вмісту простагландинів у напрямку, що сприяє агрегації тромбоцитів.

2. Вплив 12-краун-4 та йонізувального випромінення підвищує коагулянтні можливості еритроцитів, хоча до ідентичного ефекту можуть призводити різні механізми.

3. Подібність впливу йонізувального випромінення та 12-краун-4 на показники процесу коагуляції крові вказує на наявність радіоміметичних властивостей у останнього.

Література

1. Хираока М. Краун-соединения, свойства и применение. — М.: Мир, 1986. — 277 с.
2. Максютин Н. П., Ветютнева П. А., Назаренко А. Ю., Митченко Ф. А. // Фарм. журн. — 1991. — № 3. — С. 67–74.
3. Кратенко Р. И. Анализ продуктов гидролитической и термической деструкции макроциклических эфиров // Гигиена населенных мест. — К., 2001. — Т. 2, вып. 38. — С. 211–216.
4. Кратенко Р. И. Биологическая активность краун-эфиров в связи с проблемой охраны водных объектов. — Харьков: ХГМУ, 2001. — 207 с.
5. Кузин А. М. Структурно-метаболическая теория радиобиологии. — М.: Наука, 1986. — 256 с.
6. Жуков В. И., Митряев А. Б., Кратенко Р. И. // УРЖ. — 2002. — Т. X, вып. 1. — С. 37–40.
7. Кратенко Р. И., Митряев А. Б. // Там же. — Вып. 2. — С. 167–170.
8. Винина Л. Э. Взаимосвязь гемокоагулирующей активности эритроцитов и перекисного окисления липидов при экспериментальной патологии головного мозга и коррекции полипептидами // Системно-антисистемная регуляция в живой и неживой природе: Сб. научн. тр. симп. — К., 1993. — С. 50–51.
9. Test S. T., Mitsuyoshi J. // J. Lab. Clin. Med. — 1997. — Vol. 130, № 2. — P. 123–125.
10. Простагландины / Под ред. И. С. Ажгихина. — М.: Медицина, 1978. — 416 с.
11. Andrews D. A., Low P. S. // Curr. Opin. Hematol. — 1999. — Vol. 2. — P. 76–82.
12. Ланг С. М., Уилсон Р. П. // Лаб. животн. — 1993. — Т. 3, № 2. — С. 101–100.
13. Брицке М. Е. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ. — М.: Химия, 1982. — 280 с.
14. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 154 с.

Надходження до редакції 19.05.2006.

Прийнято 24.05.2006.

Адреса для листування:
Кратенко Роман Іванович,
пр-т 50-річчя ВЛКСМ, 86, кв. 111, Харків, 66112, Україна