

УДК 576.3+577.3

**В. В. Жирнов<sup>1</sup>✉, И. Н. Яковенко<sup>1</sup>, В. М. Войцицкий<sup>2</sup>, С. В. Хижняк<sup>2</sup>,  
О. Г. Зубрикова-Чугайнова<sup>3</sup>, В. А. Горобец<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии и нефтехимии Национальной академии наук Украины, ул. Мурманская, 1, г. Киев, 02660, Украина

<sup>2</sup>Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, ул. Героев Оборона, 15, г. Киев, 03041, Украина

<sup>3</sup>Государственное учреждение “Институт сердца” Министерства здравоохранения Украины, ул. Братиславская, 5а, г. Киев, 02660, Украина

## **РЕАКЦИЯ ДЗЕТА ПОТЕНЦИАЛА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ГАРДОС КАНАЛОВ НА ФОНЕ $\beta$ -ИЗЛУЧЕНИЯ МАЛОЙ МОЩНОСТИ**

**Цель работы.** Изучение реакции дзета потенциала (ДП) мембран эритроцитов человека при модификации активаторами и блокаторами функционального состояния  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых калиевых каналов в поле радиоизотопного излучения  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  малой мощности.

**Материалы и методы.** Эритроциты получали из донорской крови. ДП вычисляли по полученному значению электрофоретической подвижности клеток. В клеточные суспензии предварительно вносили исследуемые вещества, а затем аликвоты раствора  $^{90}\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ , чтобы получить конечную концентрацию 44,4 кБк·л<sup>-1</sup>.

**Результаты.** Радиоизотопное излучение  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  (РИ, 15 мкГр/ч) повышает абсолютное значение ДП (ДПаб) мембран эритроцитов и его действие является обратимым. Это указывает на то, что эффект опосредуется неионизирующей компонентой РИ. Дибутирил-цАМФ в диапазоне концентраций 1–100 мкМ дозозависимо повышает ДПаб мембран эритроцитов, но РИ не усиливает его эффект. Анаприлин в концентрациях 10 и 100 мкМ дозозависимо повышает ДПаб. Эффект максимальной концентрации анаприлина (100 мкМ) – снижается РИ. Клотримазол в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ повышает ДПаб мембран эритроцитов относительно контроля, тогда как его максимальная концентрация – снижает, а минимальная – достоверно не влияет на этот показатель. Действие клотримазола на ДП при концентрациях 10–100 мкМ отменяется РИ, но не изменяется при 0,1–1 мкМ. Нитрендипин во всем диапазоне концентраций дозозависимо повышает ДПаб мембран эритроцитов, а РИ усиливает его действие.

**Выводы.** 1. Для ионизирующей компоненты радионуклидного излучения существует порог биологического действия на клетки, определяемый эффективностью их антиоксидантной системы. 2. При мощности доз ниже пороговой действие радиоизотопного излучения опосредуется его неионизирующей компонентой и является обратимым, а поэтому определяется только в поле излучения.

**Ключевые слова:** Гардос канал, дзета потенциал,  $\beta$ -излучение, биомембраны, стронций-90, эритроциты человека.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2015. Вип. 20. С. 490–499.*

✉ Жирнов Виктор Валентинович, e-mail: vic@bpci.kiev.ua

V. V. Zhirnov<sup>1</sup>✉, I. N. Iakovenko<sup>1</sup>, V. M. Voitsitskiy<sup>2</sup>, S. V. Khyzhnyak<sup>2</sup>,  
O. G. Zubrikova-Chugainova<sup>3</sup>, V. A. Gorobetz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry & Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine., 1 Murmanska St., Kyiv, 02660, Ukraine*

<sup>2</sup>*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15 Heroyiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine*

<sup>3</sup>*Public institution "Institute of Heart" of the Ministry of Health of Ukraine, 5A Bratyslavska St., Kyiv, 02660, Ukraine*

## **Zeta potential response of human erythrocyte membranes to the modulators of Gardos channel activity under low rate $\beta$ -radiation**

**Objective.** Study of human erythrocyte DP response under modification by activators and blockers of the functional state of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels under low rate  $\beta$ -radiation.

**Materials and methods.** Erythrocytes were isolated from the donor blood. The zeta potential was computed from the value of the cell electrophoretic mobility. The investigated drugs preliminary introduced in cellular suspensions, and then aliquote of  $^{90}\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  solution to get the final activity concentration of 44.4 kBq·l<sup>-1</sup>.

**Results.** The radioisotope radiation of  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  (RR, 15 mGy·h<sup>-1</sup>) increases an absolute value of erythrocyte membranes DP (DPab), and its action is reversible. It specifies the effect is mediated by nonionizing part of the RR. Dibutyl- $\text{cAMP}$  dose-independent increases DPab of erythrocyte membranes in the concentration range of 1–100  $\mu\text{M}$ , but RR does not amplify this effect. Anapriline increases dose-independent DPab in concentrations 10 and 100 mM. The effect of maximal concentration of anapriline (100  $\mu\text{M}$ ) decreases by RR. Clotrimazol increases DPab of erythrocyte membranes in the concentration range of 0,1–10  $\mu\text{M}$  relatively control, while its maximal concentration - decreases, and the minimal level does not reliably influence on this index. The action of clotrimazol on DP in concentrations of 10–100  $\mu\text{M}$  is abolished by RR, and is not changed in the range of 0,1–1,0  $\mu\text{M}$ . Nitrendipine raises DPab of erythrocyte membranes in all of range of concentrations, and RR amplifies the effect of the drug.

**Conclusions.** 1. There is a threshold of the biological action on cells for the ionizing component of radioisotope radiation determined by effectivity of operation their antioxidant system.

2. At dose rates below a threshold, the action of ionizing radiation is mediated by its nonionizing component, and is reversible, and therefore is determined only in the field of radiation.

**Key words:** Gardos channel, zeta potential,  $\beta$ -radiation, strontium-90, human erythrocytes, biomembranes.

*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2015;20:490-499.*

### **ВСТУПЛЕНИЕ**

Катионные каналы – многофункциональные белковые транспортеры, ответственные за регулировку мембранного потенциала покоя в большинстве клеток, индукцию потенциала действия в возбудимых клетках и трансмембранную трансдукцию во многих сигнальных каскадах, а также и ионный обмен в целом. Так,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые  $\text{K}^+$ -каналы эритроцитов человека участвуют в регуляции их объема и апоптоза через  $\text{K}^+$ -специфический протеин мембраны (Гардос-канал) [1, 2]. Идентифицировано несколько подтипов  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов и изучены их физиологические характеристики в разных клетках [3]. Гардос-канал эритроцитов идентифицирован как  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемый канал промежуточной проводимости (KCNN4, или KCa3.1). Показано, что агенты, которые повышают уровень цАМФ в клетках, индуцируют харибдотоксин-чувствительный поток  $\text{K}^+$ , который зависит от

### **INTRODUCTION**

Cation channels are multifunction protein transporters, accountable for regulation of rest membrane potential in most cells, potential action induction in excitable cells, and transmembrane transduction in many signal cascades, and also ionic exchange on the whole. So,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel of human erythrocytes participates in adjusting of their volume and apoptosis through  $\text{K}^+$  specific membrane protein (Gardos channel) [1,2]. A few subtypes of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels are identified, and their physiology properties are studied in different cells [3]. The erythrocyte Gardos channel is identified as  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel of intermediate conductivity (KCNN4, or KCa3.1). It is shown that agents which promote the level of cAMP in cells induces the charybdotoxin sensitive current of  $\text{K}^+$ , which depends on the

присутствия  $\text{Ca}^{2+}$  [4, 5]. Неизбирательный блокатор  $\beta$ -адренорецепторов, анаприлин, в низких концентрациях также активирует выход  $\text{K}^+$  из клеток путем повышения чувствительности канального белка к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ , но в высоких концентрациях он действует как ингибитор, снижая уровень цАМФ в эритроцитах [6].

Из известных блокаторов Гардос канала, лучше всего охарактеризован блокатор цитохрома P-450 клотримазол, который ингибирует канал путем прямого взаимодействия и уменьшает потерю калия при обработке клеток кальциевым ионофором A23187 [7]. К ингибиторам  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{K}^+$ -каналов принадлежит и блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нитрендипин, который эффективен в эритроцитах ( $\text{IC}_{50} = 10^3$  нМ) [8]. Он действует путем прямой блокировки выхода  $\text{K}^+$  через Гардос каналы. Все эти лиганды при взаимодействии с мембранными белками изменяют их конформацию, что в случае изменения электростатических взаимодействий между макромолекулами плазматической мембраны может привести к изменению ее поверхностного потенциала. Ранее нами было показано, что радионуклидное излучение ( $^{90}\text{Sr}$  и  $^{14}\text{C}$ ) в малых дозах (0,5 и 1 мкГр, соответственно) повышает абсолютную величину дзета потенциала ( $\text{ДП}_{\text{аб}}$ ) эритроцитов и лейкоцитов крови человека, отражающего функциональное состояние клеток [9]. Более того, были получены данные, свидетельствующие о том, что этот эффект реализуется через мембранные сигнальные системы [10, 11] и сопровождается структурными перестройками мембраны эритроцитов [12].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение реакции дзета потенциала мембран эритроцитов человека при модификации активаторами и блокаторами функционального состояния  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых калиевых каналов в поле радиоизотопного излучения  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  малой мощности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные реактивы получены из фирмы Sigma-Aldrich. Эритроциты получали из донорской крови центрифугированием при 2000 г в течение 10 мин при комнатной температуре. Для определения величины ДП измеряли электрофоретическую подвижность клеток в электрофоретическом растворе ( $\text{KCl} - 2,5$ ;  $\text{CaCl}_2 - 2,0$ ; глюкоза - 280,0; Трис- $\text{HCl} - 10,0$ ; значения даны в ммоль/л,  $\text{pH} = 7,4$ ) согласно [13]. ДП вычисляли по полученному значению электрофоретической подвижности, используя приближение Гельмгольца-Смолуховского с помощью программы Zeta for

presence of  $\text{Ca}^{2+}$  [4,5]. Nonselective antagonist  $\beta$ -adrenoreceptors, anapriline, in low concentrations also activates the exit of  $\text{K}^+$  from cells by increasing sensitivity of the channel protein to  $\text{Ca}^{2+}$  ions, but in high concentrations it operates as an inhibitor lowering cAMP level in erythrocytes [6].

From known Gardos channel blocker, cytochrome P-450 inhibitor clotrimazol is the best of all described which blocks Gardos channel by direct cooperation and diminishes the potassium loss at treatment of cells with calcium ionophore of A23187 [7]. To inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels belongs and inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$  channels nitrendipine, which is effective in erythrocytes ( $\text{IC}_{50} = 10^3$  нМ) [8]. Nitrendipine operates by the direct blocking of  $\text{K}^+$  output through Gardos channels. All of these ligands at interaction with membrane proteins change their conformation that in the case of change of electrostatic interactions between the plasma membrane macromolecules can cause the change of membrane surface potential. It has been previously shown by us that the radioisotope radiation ( $^{90}\text{Sr}$  and  $^{14}\text{C}$ ) is in small absorbed doses (0,5 and 1 mGy), accordingly, raises an absolute value of zeta potential ( $Z_{\text{ab}}$ ) in human erythrocytes and leucocytes reflecting the cell functional state [9]. Moreover, data that this effect is able to be realize through the membrane signal systems [10,11] and is accompanied by structural rearrangements of erythrocyte membrane was obtained [12].

## OBJECTIVE

Study of human erythrocyte DP response under modification by activators and blockers of the functional state of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent potassium channels in the field of low rate radioisotope radiation.

## MATERIALS AND METHODS

Erythrocytes were isolated from the whole donor blood by centrifugation at 2,000 g for 10 min at room temperature. The electrophoretic mobility cells as indicator of their zeta potential was determined in the electrophoretic solution ( $\text{KCl} - 2.5$ ;  $\text{NaCl} - 5,6$  mM;  $\text{CaCl}_2 - 2.0$ ; glucose - 280.0; Tris- $\text{HCl} - 10.0$  mM,  $\text{pH} = 7.4$ ) at room temperature using a cylindrical microelectrophoresis [7]. The zeta potential was computed from the value of the electrophoretic mobility using the approximation of Helmholtz-

Windows. Облучение было выполнено путем добавления в 1 см стерильную кювету, содержащую клеточную суспензию ( $\sim 1 \cdot 10^6$  кл/мл), раствора  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ , чтобы получить конечную концентрацию 44,4 кБк/л. Предполагая, что радиоизотопы равномерно распределены по всему объему клеточной суспензии, мощность дозы вычислялась, как описано ранее [12]. В клеточных суспензиях концентрация внесенного  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  не превышала 2,3 нМ. В предварительных исследованиях установлено, что нерадиоактивный стронций в такой концентрации не оказывал влияния на ДП. Препараты вносили в среду инкубации после добавления аликвоты  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  в концентрациях, указанных в таблицах. Данные выражены как средние значения  $\pm$  среднеквадратичные ошибки среднего. Статистическую достоверность различий между группами оценивали по t-тесту Стьюдента. Объемы выборок везде равны 10. Математическая обработка результатов проводилась с помощью программы Statistica v6.0 для Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наложенное поле  $\beta$ -излучения с мощностью дозы 0,15 и 1,5 мкГр  $\cdot$  ч<sup>-1</sup> не влияло на ДП в течение одночасовой экспозиции. Дальнейшее повышение мощности дозы увеличивало ДП<sub>аб</sub>, примерно, на 8 % (табл. 1).

Следует отметить, что ДП эритроцитов различных доноров имели разную чувствительность к РИ малой мощности, как это было показано и для пострadiационного действия ионизирующего излучения значительно более высокой мощности [13]. Однако даже эритроциты, ДП которых не изменялся в поле РИ малой мощности, отличались реакцией ДП на лиганды мембранных белков в наложенном поле и вне его (данные не показаны), как и в случае эритроцитов с чувствительным ДП.

Молярная концентрация  $^{90}\text{Sr}^{2+}$  в среде инкубации была на семь порядков ниже таковой для  $\text{Ca}^{2+}$ , т.е. радиоактивный стронций не может поступить в клетку в

Smoluchowski by means of "Zeta for Windows" application. Irradiation was performed by supplement of  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  solution in 1-cm sterile glass vials containing the cell suspensions ( $\sim 1 \cdot 10^6$  cells/ml) to obtain the final activity concentration 44.4 kBq $\cdot$ l<sup>-1</sup>. Assuming that the radioisotopes are uniformly distributed throughout the cell suspension, the dose rates were calculated as described previously [12]. In cellular suspensions the concentration of  $^{90}\text{Sr}$  did not exceed 2.3 nM. Such concentration of nonradioactive strontium did not have influence on ZP (data is not shown). The data are given as means  $\pm$  SEM. Significant statistical differences between groups were evaluated using the Student t test ( $p < 0.05$ ). Sample numbers are equal 10 everywhere. Statistical analysis of the results was performed by means of the program of Statistica v6.0 for Windows.

## RESULTS AND DISCUSSION

The  $\beta$ -radiation field emitted by  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  with the dose rate of 0.15 and 1.5 mGy  $\cdot$  h<sup>-1</sup> does not influence on zeta potential of erythrocytes for one-hour exposure. Further augmentation of the dose rate increases ZP<sub>ab</sub> approximately 8% (Table 1).

It should be noted that erythrocyte DP of different donors had a different sensitivity to the low rate radiation, as it was shown and for the post-radiation action of IR considerably higher rate [13]. However even erythrocytes, ZP of which did not change in the field of the low rate radiation, had a differed reaction of ZP on membrane protein ligands under and out of the imposed field (data is not shown), as well as in the case of erythrocytes with sensitive ZP.

The molar concentration of the  $^{90}\text{Sr}^{2+}$  in the incubation medium calculated was by seven orders magnitude less than that for  $\text{Ca}^{2+}$ , i.e.,

**Таблица 1**

**Влияние наложенного поля радиоизотопного излучения малой мощности (15 мкГр/ч) на ДП эритроцитов человека**

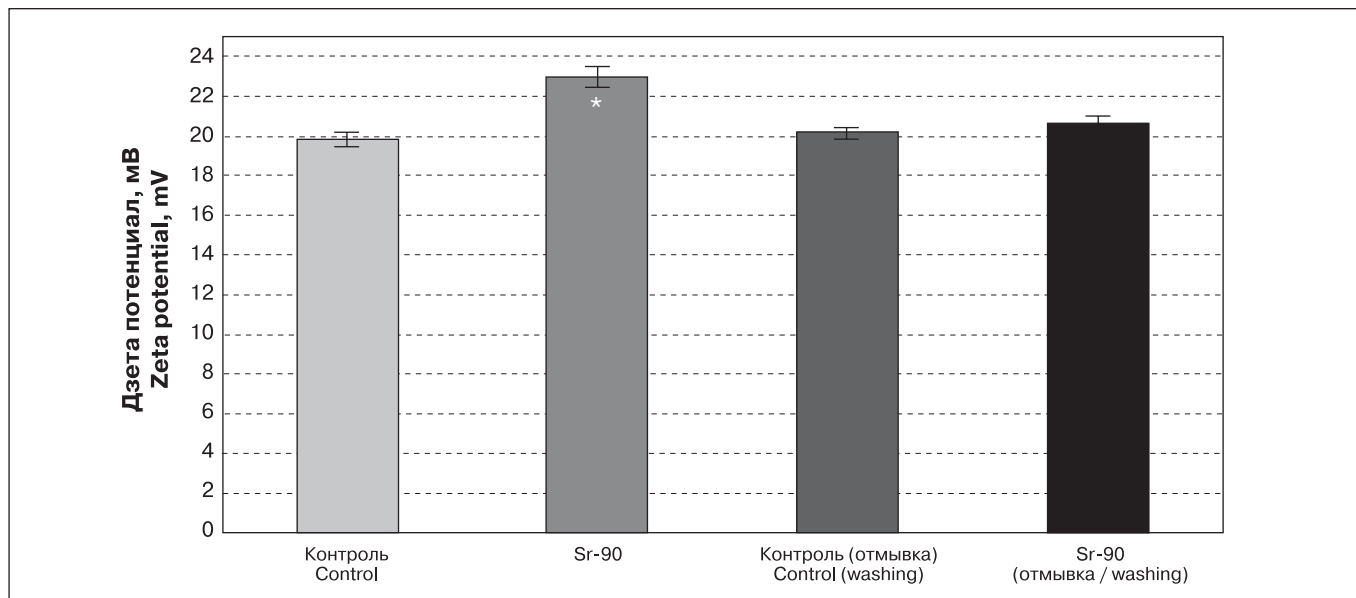
**Table 1**

**Effect of superimposed field of the low power radioisotope radiation (15  $\mu$ Gy/h) on human erythrocyte ZP**

Параметр Parameter	Поглощенная доза, мкГр / absorbed dose, mGy			
	фон / background	0,15	1,5	15
ДП, мВ / ZP, mV	-21,90 $\pm$ 0,24	-21,97 $\pm$ 0,19	-22,53 $\pm$ 0,32	-23,59 $\pm$ 0,29*
% к контролю / % to control	100,0	100,3	102,5	107,7

Примечание. \* – наличие достоверных отличий от контроля (фоновое облучение),  $p \leq 0,05$ ,  $n = 10$ .  
Note. \* – significant difference vs. control (background radiation),  $p \leq 0.05$ ,  $n = 10$ .





**Рисунок 1.** Влияние отмывки на ДП эритроцитов, преинкубированных со  $^{90}\text{Sr}$  в течение 1 часа

\* – Наличие достоверного отличия от контроля (без отмывки),  $p \leq 0.05$ ,  $n = 10$

**Figure 1.** The effect of washing on zeta potential of erythrocytes preincubated with  $^{90}\text{Sr}$  for 1 hour

\* – significance difference from the control (without washing),  $p \leq 0.05$ ,  $n = 10$ .

ощутимых количествах через кальциевые каналы. Поэтому радиоизотопы можно рассматривать как внешний радиационный источник относительно клеток. Это подтверждается данными, полученными на эритроцитах, которые предварительно инкубировали с используемой концентрацией  $^{90}\text{Sr}^{2+}$  в течение 2 часов, а затем отмывали в фосфатном буфере (рис. 1). Анализ результатов, представленных на рис. 1 свидетельствует, что отмывка практически полностью отменяет эффект радиоизотопов на ДП эритроцитов человека.

Дибутирил-цАМФ в диапазоне концентраций 1–100 мкМ дозозависимо повышает ДП<sub>аб</sub> эритроцитов (табл. 2). Радиоизотопное излучение (15 мкГр/ч) оказывает аналогичное действие, но не усиливает эффект дибутирил-цАМФ в диапазоне эффективных концентраций. В недействующем диапазоне концентраций препарата (10–100 нМ) проявляется лишь эффект ионизирующего излучения.

Анаприлин в концентрациях 10 и 100 мкМ, при которых он снижает уровень цАМФ в эритроцитах [6], дозозависимо уменьшает ДП<sub>аб</sub> приблизительно на 40 % относительно контроля. В меньших концентрациях анаприлин не изменяет значение ДП, несмотря на то, что он повышает чувствительность канального белка к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. Радиоизотопное излучение снижает эффект максимальной концентрации анаприлина (100 мкМ) в среднем на 10 % (частично аддитивный ответ), а при 10 мкМ отменяет. При недействующих концентрациях препарата (10–100 нМ) проявляется лишь эффект радиации.

the  $^{90}\text{Sr}^{2+}$  cannot enter the cells in appreciable quantities. Therefore, radioisotopes can be considered as external radiation source with regard to the cells. It was confirmed by our finding obtained with the red cells preincubated for 2 h with concentration of  $^{90}\text{Sr}$  used, and then washed with the phosphate buffer (Fig. 1). It was seen that the washing practically fully eliminated the effect  $\beta$ -radiation on ZP of human erythrocytes.

Dibutylryl cAMP dose-dependent increases the erythrocyte DP<sub>ab</sub> in the concentration range of 1–100 mM (Table 2). The radioisotope radiation (15 mGy · h<sup>-1</sup>) renders the analogical action, but it does not enhance the effect of dibutylryl cAMP in the effective concentration range of the preparation. The effect of ionizing radiation appears in the noneffective concentration range of the preparation only.

Anaprilin in concentrations of 10 and 100 mM, which reduces the level of cAMP in erythrocytes [6], dose-independent decreases DP<sub>ab</sub> by approximately 40 % relatively control. Anaprilin does not change a value DP in fewer concentrations in spite of the fact that it increases the sensitivity of the protein channel to the  $\text{Ca}^{2+}$  ions [6]. The radioisotope radiation reduces the effect of the maximal concentration of anaprilin (100 mM) by 10 % (partial additive response), and abolishes the effect of 10 mM. The effect of radiation at the inactive concentrations of the preparation shows up only.

**Таблица 2**

**Влияние дибутирил-цАМФ и анаприлина на ДП мембран эритроцитов человека (мВ) в поле радиоизотопного излучения (15 мкГр·ч<sup>-1</sup>)**

**Table 2**

**Effect of dibutyryl cAMP, and anapriline on zeta potential of the human erythrocytes (mV) under the imposed field of  $\beta$ -radiation (15  $\mu$ Gy·h<sup>-1</sup>)**

Условия опыта Experimental conditions	Концентрация препаратов, М / concentration of drugs, M					
	0	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
Дибутирил-цАМФ / dibutyryl cAMP % от контроля / % to control	-19,56 ± 0,51	-24,02 ± 1,10*	-25,27 ± 0,96*	-24,58 ± 1,06*	-20,06 ± 0,60	-19,89 ± 0,38
Дибутирил-цАМФ + <sup>90</sup> Sr / dibutyryl cAMP + <sup>90</sup> Sr % от контроля / % to control	-23,69 ± 0,58* 121,1	-24,48 ± 0,57* 125,1	-24,96 ± 0,70* 127,6	-25,08 ± 0,57* 128,2	-23,47 ± 0,60* 120,0	-23,86 ± 0,62* 122,0
Анаприлин / anapriline % от контроля / % to control	-20,04 ± 0,38	-12,23 ± 0,36* 61,0	-12,33 ± 0,55* 61,5	-18,91 ± 0,41* 94,4	-20,74 ± 0,46 103,5	-20,13 ± 0,45 100,4
Анаприлин + <sup>90</sup> Sr / anapriline + <sup>90</sup> Sr % от контроля / % to control	-23,64 ± 0,51 118,2	-16,80 ± 0,53* 83,9	-23,26 ± 0,51* 116,1	-24,51 ± 0,41* 122,3	-24,82 ± 0,60* 123,9	-24,65 ± 0,27* 123,0

Примечание. Здесь и далее: \* – наличие достоверного отличия от контроля (в отсутствие препарата и <sup>90</sup>Sr), p ≤ 0.05, n=10.  
Note. Here and next: \* – significant difference relative to control (in lack of drugs and <sup>90</sup>Sr); p ≤ 0.05, n = 10.

Клотримазол (для Гардос канала концентрация препарата, ингибирующая активность канала на 50%, ID<sub>50</sub>=50 нМ) в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ увеличивает ДП<sub>аб</sub> мембран эритроцитов относительно контроля, тогда как его максимальная концентрация – снижает, а минимальная – достоверно не влияет на этот показатель (табл. 3). Ионизирующая радиация увеличивает ДП<sub>аб</sub>, но, тем не менее, отменяет действие клотримазола в концентрациях как понижающих (100 мкМ), так и повышающих (10 мкМ) ДП<sub>аб</sub> и, по-видимому, проявляет только свое действие при концентрациях клотримазола 1 мкМ и ниже.

В отличие от клотримазола, нитрендипин (ID<sub>50</sub> = 100 нМ) во всем диапазоне концентраций, за исключением минимальной, дозозависимо повышает ДП<sub>аб</sub> эритроцитов, а  $\beta$ -излучение усиливает его действие. В данном случае наблюдается полное аддитивное взаимодействие  $\beta$ -излучения с нитрендипином.

Полученные данные указывают, что  $\beta$ -излучение малой мощности в большинстве случаев изменяет действие модификаторов активности Ca<sup>2+</sup>-зависимых K<sup>+</sup>-каналов на поверхностный потенциал эритроцитов. Но похоже на то, что это связано не только с изменением их взаимодействия со специфическими лигандами вследствие общей структурной перестройки мембраны в поле излучения [12]. Не исключено, что наблюдаемые эффекты реализуются в результате взаимодействия этих препаратов и с другими белковыми мишенями. Так, например, нитрендипин также может взаимодействовать с Ca<sup>2+</sup>-каналами и  $\alpha_1$ -адренорецепторами. Эти и ранее полученные данные указывают, что изменение чувствительности эритроцитов к регу-

Clotrimazol (for Gardos channel ID<sub>50</sub>=50 nM) increases DP<sub>ab</sub> of erythrocytes in the concentration range of 0.1–10 mM relatively control, while its maximal concentration – decreases, and the minimal level does not reliably influence on this index (table. 3). The ionizing radiation increases DP<sub>ab</sub>, but nevertheless abolishes the action of clotrimazol in concentrations both lowering (100  $\mu$ M) and raising (10  $\mu$ M) DP<sub>ab</sub>, and presumably it only shows the proper action at the concentrations of clotrimazol of 1  $\mu$ M and below.

Unlike clotrimazol, all concentration of nitrendipine (ID<sub>50</sub> = 100 nM), except the minimal one, increase ZP<sub>ab</sub> of erythrocytes dose-independent, and  $\beta$ -radiation amplifies the effect of the drug. In this case there is complete additive interaction  $\beta$ -radiation with nitrendipine.

The findings specify that low rate  $\beta$ -radiation in most cases changes effects of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel activity modifiers on erythrocyte surface potential. But look like that it is related not only to the change of their interaction with specific ligands because of joint structural rearrangement of membrane in the radiation field [12]. It does not exclude that the dose-dependent effects observed will be realized as a result of interaction of these drugs and with other protein targets. So, for example, nitrendipine also can interact with Ca<sup>2+</sup> channels, and  $\alpha_1$ -adrenoreceptors. These and previously findings [15] specify that change the sensitivity of erythrocytes to the regulators of Ca<sup>2+</sup>-depend-

**Таблица 3**

**Влияние блокаторов Ca<sup>2+</sup>-зависимых K<sup>+</sup>-каналов на ДП мембран эритроцитов человека (мВ) в поле радиоизотопного излучения (15 мкГр·ч<sup>-1</sup>)**

**Table 3**

**Effect of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel blockers on zeta potential of the human erythrocytes (mV) under the imposed field of β-radiation (15 μGy·h<sup>-1</sup>)**

Условия опыта Experimental conditions	Концентрация препаратов, М / concentration of drugs, M					
	0	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
Клотримазол / clotrimazol % от контроля / % to control	-18,33 ± 0,36 113,1	-15,55 ± 0,79* 84,5	-20,90 ± 0,72* 114,0	-20,71 ± 0,77* 113,0	-19,89 ± 0,62* 108,0	-19,15 ± 0,70 104,0
Клотримазол + <sup>90</sup> Sr / clotrimazol + <sup>90</sup> Sr % от контроля / % to control	-20,73 ± 0,51* 113,1	-18,50 ± 0,50 101,0	-18,84 ± 0,34 103,1	-20,73 ± 0,51* 113,1	-20,72 ± 0,50* 113,0	-21,07 ± 0,51* 115,4
Нитрендипин / nitrendipine % от контроля / % to control	-22,01 ± 0,24	-24,26 ± 1,22* 110,2	-24,26 ± 1,03* 110,2	-23,83 ± 0,96* 108,9	-23,78 ± 0,98* 108,0	-21,62 ± 0,68 98,2
Нитрендипин + <sup>90</sup> Sr / nitrendipine + <sup>90</sup> Sr % от контроля / % to control	23,71 ± 0,29* 107,7	26,11 ± 0,86* 118,6	26,19 ± 1,06* 119,0	25,70 ± 0,65* 116,7	25,35 ± 0,67* 115,2	23,72 ± 0,99* 107,8

ляторам активности Ca<sup>2+</sup>-зависимых K<sup>+</sup>-каналов может привести к нарушению нейрогуморальной регуляции в целом организме при перманентном облучении даже ионизирующей радиацией малой мощности.

Следует отметить, что действие радиоизотопного излучения на ДП и механическую стабильность мембран эритроцитов человека является обратимым, т.е. не повреждающим мембранные структуры клетки [9, 15]. В этом случае интенсивность образования свободных радикалов ионизирующим излучением малой мощности, по-видимому, не превышает суммарную антирадикальную активность клетки. Действительно, в табл. 4 приведены данные о скоростях образования активных форм кислорода (АФК), индуцированных ионизирующим излучением в результате радиолитического разложения воды [16] и образующиеся в эритроцитах при клеточном метаболизме [17].

Анализ результатов, представленных в табл. 4, свидетельствует, что скорость образования АФК в эритроцитах при мощности ионизирующего излучения, лежащей в микрогревном диапазоне, значительно уступает метаболической, учитывая, что последняя касается только скорости образования радикалов ·ОН. Следовательно, антирадикальная активность эритроцитов может вполне дезактивировать радиационно образующиеся АФК.

Согласно Padmanabha Rao [18], когда β-частица или γ-излучение, проходя через электростатическое поле, создаваемое электронной оболочкой, теряют энергию в виде электромагнитного излучения, энергия которого выше энергии ультрафиолетового излучения. Обычно эта энергия возбуждает валентный электрон, который излучает ее преимущественно в ультрафиолетовом диапазоне спектра при комнат-

ent K<sup>+</sup> channel activity can result in a disorder of the neurohumoral regulation in a whole organism under a permanent irradiation even by ionizing radiation of low rate.

It should be noted that action of the radioisotope radiation on DP and mechanical stability of human erythrocyte membrane is convertible, and it does not damage the cellular membrane structures [9, 15]. In this case intensity of free radicals formation by the low rate ionizing radiation does not presumably exceed total antiradical activity of cells. The formation rates of active forms of oxygen (AFO) induced by the ionizing radiation as a result of water radiolysis [16], and generated in erythrocytes by way of cellular metabolism [17] are shown in the Table 4.

As shown in Table 4, the formation rate of AFO in erythrocytes under low rate ionizing radiation lying in a range of 40–400 mGy · h<sup>-1</sup> is considerably less than metabolic one, taking into account that the last in regard to only the formation rate of the ·OH radicals. Consequently, antiradical activity of erythrocytes can completely deactivates AFO induced by the radiation.

According to Padmanabha Rao [18], when β-particle or γ-radiation passed through the electrostatic field created in an electronic shell, lose energy as an electromagnetic radiation, the energy which higher than energy of ultraviolet radiation. Usually this energy excites a valence electron which emit it mainly in the ultraviolet range of spectrum (~80 % for <sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y), but also

**Таблица 4**

**Сравнительная характеристика скорости образования активных форм кислорода (АФК), индуцированных ионизирующим излучением и образующихся при клеточном метаболизме**

**Table 4**

**Comparative characteristic of the formation rate of active forms of oxygen (AFO), induced by ionizing radiation, and generated in erythrocytes by way of cellular metabolism**

Мощность дозы, мГр ч <sup>-1</sup> Dose rate, mGy h <sup>-1</sup>	Скорость продукции АФК, нмоль л <sup>-1</sup> час <sup>-1</sup> Rate of formation AFO, nmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		Пострадиационные реакции Postradiation responses	Полевые эффекты Field effects
	метаболическая* [17] metabolic* [17]	индуцированная ИР [16] induced by IR [16]		
Фон / background	0,5	-		
0,04		0,025		
0,4		0,25	Отсутствуют / not appear	Присутствуют / appear
4		2,5	Выраженные клеточные реакции Evident cellular responses	Маскируются пострадиационными Not appear
> 60		> 37,5	Системный ответ, оксидативный стресс Systemic response, oxidative stress	

Примечание. \* – расчетные значения только по продукции гидроксильного радикала ·OH.  
Note. \* – estimated values of only the ·OH production.

ной температуре (~80% для <sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y), но также в видимом и инфракрасном диапазоне (~20%) [18]. Вероятно, именно эти образующиеся компоненты при взаимодействии β-излучения с веществом и вызывают обратимые эффекты, наблюдаемые в поле ионизирующего излучения малой мощности.

Ввиду того, что неионизирующая компонента ионизирующего излучения вызывает существенные изменения структурно-функционального состояния биомембран, использование радиоактивной метки для изучения нативной функциональной активности мембраносвязанных белков является проблематичным и требует подтверждения полученных результатов нерадиоизотопными методами. Например, при радиоизотопном (<sup>86</sup>Rb) определении АТФ-индуцируемых катионных потоков в эритроцитах [19] мощность дозы ионизирующего излучения составляет ~30 мГр/ч, что на несколько порядков превышает мощность дозы, вызывающей структурно-функциональные возмущения в мембране, влияющие на клеточные функции [12, 14, 20].

**ВЫВОДЫ**

Из вышеизложенного следует, что:

1. Для ионизирующей компоненты радиоизотопного излучения <sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y существует порог биологического действия на клетки, определяемый эффективностью функционирования их антиоксидантной системы.
2. При мощности доз ниже пороговой действие радиоизотопного излучения <sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y опосредуется его неионизирующей компонентой и является обратимым, а поэтому определяется только в поле излучения.

in a visible and infra-red range (~20 %) at a room temperature [18]. Probably, exactly this appearing component at interaction of β-radiation with a matter causes reversible effects looked after in the field of low rate ionizing radiation.

In view of the fact that nonionizing component of ionizing radiation causes the significant changes of the structure functional state of biomembranes, the use of radioactive label for the study of native functional activity of membrane-bound proteins is problematic, and validation of the derived results is requires by non-radioisotope methods. For example, at radioisotope (<sup>86</sup>Rb) determination of cation fluxes induced by ATP in erythrocytes [19] dose rate of ionizing radiation makes ~30 mGy·h<sup>-1</sup>, that by a few order of magnitude transcends the dose rate causing structure functional perturbations in a membrane influencing on cellular functions [12, 14, 20].

**CONCLUSIONS**

It ensues from stated above that:

1. There is a threshold of the biological action on cells for the ionizing component of radioisotope radiation (<sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y) determined by effectivity of operation their antioxidant system.
2. At dose rates below a threshold, the action of radioisotope radiation (<sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y) is mediated by its nonionizing component, and is reversible, and therefore is determined only in the field of radiation.



**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis / P. A. Lang, S. Kaiser, S. Myssina [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2003. – Vol. 285, No. 6. – P. C1553–C1560.
2. Escherichia coli α-hemolysin triggers shrinkage of erythrocytes via KCa3.1 and TMEM16A channels with subsequent phosphatidylserine exposure / M. Skals, U. B. Jensen, J. Ousingsawat [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, No. 20. – P. 15557–15565.
3. Varieties of calcium-activated potassium channels / R. Latorre, A. Oberhauser, P. Labarca, O. Alvarez // *Annu. Rev. Physiol.* – 1989. – Vol. 51. – P. 385–399.
4. Pellegrino M. Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase / M. Pellegrino, M. Pellegrini // *Eur. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 436, No. 5. – P. 749–756.
5. Gerlach A. C. Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance, calcium-dependent potassium channel, hK1 / A. C. Gerlach, N. N. Gangopadhyay, D. C. Devor // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, No. 1. – P. 585–598.
6. Modulation of the Ca<sup>2+</sup> or Pb<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-selective channels in human red cells. Part I. Effects of propranolol / W. Schwarz, H. Keim, R. Fehlau, G. F. Fuhrmann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – Vol. 978, No. 1. – P. 32–36.
7. Alvarez J. High affinity inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels by cytochrome P-450 inhibitors / J. Alvarez, M. Montero, J. Garcia-Sancho // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267, No. 17. – P. 11789–11793.
8. Nitrendipine is a potent inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of human erythrocytes / J. C. Ellory, K. Kirk, S. J. Culliford [et al.] // *FEBS Letters.* – 1992. – Vol. 296, No. 6. – P. 219–221.
9. Zhirnov V. V. Human blood cells zeta potential response under imposed β-radiation field of low rate / V. V. Zhirnov, I. N. Iakovenko // *Proceeding the First International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research* / Goran Ristic editor. 2012 April 25–27; Nis, Serbia. – Nis : University of Nis, 2012. – P. 145–148.
10. Жирнов В. В. Влияние β-излучения на поверхностный потенциал эритроцитов человека при ингибировании метаболизма эйкозаноидов / В. В. Жирнов, В. Н. Гавий, С. А. Казимиров // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – Т. 76, № 2. – С. 40–45.
11. Вплив форсколіну та хінакрину на функції лейкоцитів за дії радіації в низьких дозах / В. В. Жирнов, Л. О. Метелиця, Л. Л. Чарочкіна [та ін.] // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – Т. 75, № 1. – С. 54–58.
12. Zhirnov V. V. The effects of ultra-low dose beta-radiation on the physical properties of human erythrocyte membranes / V. V. Zhirnov, S. V. Khyzhnyak, V. M. Voitsitskiy // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2010. – Vol. 86, No. 6. – P. 499–506.
13. Seaman G. V. F. Electrokinetic behaviour of red cells / G. V. F. Seaman // *The Red Blood Cell* / D. M. Surgenor, editor. – New York, 1975. – P. 1135–1229.
14. Assessment of electrophoretic mobility changes of human erythrocytes by free flow electrophoresis after in vitro and in vivo irradiation / G. A. Schreiber, A. Spiegelberg, Butkowskyj- T. Walkiv, K. W. Bogl // *Int. J. Rad. Appl. Instr. B.* – 1990. – Vol. 17, No. 4. – P. 377–380.

**REFERENCES**

1. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM. Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(6):C1553-C1560.
2. Skals M, Jensen UB, Ousingsawat J, Kunzelmann K, Leipziger J, Praetorius HA. Escherichia coli α-hemolysin triggers shrinkage of erythrocytes via KCa3.1 and TMEM16A channels with subsequent phosphatidylserine exposure. *J Biol Chem.* 2010;285(20):15557-65.
3. Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:385-99.
4. Pellegrino M, Pellegrini M. Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Physiol.* 1998;436(5):749-56.
5. Gerlach AC, Gangopadhyay NN, Devor DC. Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance, calcium-dependent potassium channel, hK1. *J Biol Chem.* 2000;275(1):585-98.
6. Schwarz W, Keim H, Fehlau R, Fuhrmann GF. Modulation of the Ca<sup>2+</sup> or Pb<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-selective channels in human red cells. Part I. Effects of propranolol. *Biochim Biophys Acta.* 1989;978(1):32-6.
7. Alvarez J, Montero M, Garcia-Sancho J. High affinity inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels by cytochrome P-450 inhibitors *J Biol Chem.* 1992;267(17):11789-93.
8. Ellory JC, Kirk K, Culliford SJ, Nash GB, Stuart J. Nitrendipine is a potent inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of human erythrocytes. *FEBS Letters.* 1992;296(6):219-21.
9. Zhirnov VV, Iakovenko IN. Human blood cells zeta potential response under imposed β-radiation field of low rate. In: Ristic G, editor. *RAD 2012; Proceeding the First International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research.* 2012 Apr 25-27; Nis, Serbia. Nis: University of Nis; 2012. p. 145-48.
10. Zhirnov VV, Gaviy VM, Kazimirov AS. [Influence of β-radiation on human erythrocyte surface potential under eicosanoid metabolism inhibition]. *Ukr Biokhim Zh.* 2004;76(2):40-5. Russian.
11. Zhirnov VV, Metelytsya LO, Charochkina LL, Mohilevych SE, Gaviy VM. [Influence of forscolin and quinacrine on leucocyte functions under the effect of radiation in low dose]. *Ukr Biokhim Zh.* 2003;75(1):54-8. Ukrainian.
12. Zhirnov VV, Khyzhnyak SV, Voitsitskiy VM. The effects of ultra-low dose beta-radiation on the physical properties of human erythrocyte membranes. *Int J Radiat Biol.* 2010;86(6):499-506.
13. Seaman GVF Electrokinetic behaviour of red cells. In: *DM Surgenor, editor. The Red Blood Cell.* New York; 1975. p. 1135-229.
14. Schreiber GA, Spiegelberg A, Butkowskyj-Walkiv T, Bogl KW. Assessment of electrophoretic mobility changes of human erythrocytes by free flow electrophoresis after in vitro and in vivo irradiation. *Int J Rad Appl Instr B.* 1990;17(4):377-80.

15. Zhirnov V. V. The osmotic resistance, and zeta potential responses of human erythrocytes to transmembrane modification of  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes in the presence of the imposed low rate radiation field of  $^{90}\text{Sr}$  / V. V. Zhirnov, I. N. Iakovenko // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. Vol. 91, No. 1. – P. 117–126.
16. Smith J. T. Low dose ionizing radiation produces too few reactive oxygen species to directly affect antioxidant concentrations in cells / J. T. Smith, N. J. Willey, J. T. Hancock // *Biol. Lett.* – 2012. – Vol. 8, No. 4. – P. 594–97.
17. Giulivi C. Hydrogen peroxide production by red blood cells / C. Giulivi, P. Hochstein, K. J. Davies // *Free Rad. Biol. Med.* – 1994. – Vol. 16. – P. 123–129.
18. Padmanabha Rao M. A. UV dominant optical emission newly detected from radioisotopes and XRF sources / M. A. Padmanabha Rao // *Braz. J. Phys.* – 2010. – Vol. 40, No. 1. – P. 38–46.
19. The P2X(7) receptor mediates the uptake of organic cations in canine erythrocytes and mononuclear leukocytes: comparison to equivalent human cell types / R. O. Stevenson, R. M. Taylor, J. S. Wiley, R. Sluyter // *Purinergic Signal.* – 2009. – Vol. 5, No. 3. – P. 385–394.
20. Zhirnov V. V. Ultra-low dose beta-irradiation induces constriction of rabbit carotid arteries via the endothelium / Zhirnov V. V., Iakovenko I. N. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2005. – Vol. 11, No. 11. – P. 813–820.
15. Zhirnov VV, Iakovenko IN. The osmotic resistance, and zeta potential responses of human erythrocytes to transmembrane modification of  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes in the presence of the imposed low rate radiation field of  $^{90}\text{Sr}$ . *Int J Radiat Biol* 2015;91(1):117-26.
16. Smith JT, Willey NJ, Hancock JT. Low dose ionizing radiation produces too few reactive oxygen species to directly affect antioxidant concentrations in cells. *Biol Lett.* 2012;8(4):594-97.
17. Giulivi C, Hochstein P, Davies KJ. Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Rad Biol Med.* 1994(16):123-29.
18. Padmanabha Rao MA. UV dominant optical emission newly detected from radioisotopes and XRF sources. *Braz J Phys* 2010;40(1):38-46.
19. Stevenson RO, Taylor RM, Wiley JS., Sluyter R. The P2X(7) receptor mediates the uptake of organic cations in canine erythrocytes and mononuclear leukocytes: comparison to equivalent human cell types. *Purinergic Signal.* 2009;5(30):385-94.
20. Zhirnov VV, Iakovenko IN. Ultra-low dose beta-irradiation induces constriction of rabbit carotid arteries via the endothelium. *Int J Radiat Biol.* 2005;11(11):813-20.

*Стаття надійшла до редакції 5.09.2015*

*Received: 5.09.2015*