

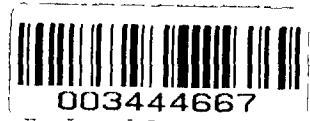
На правах рукописи

ШВЫДЮК
Олег Николаевич

**ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА КАЛЬЦИЙ-
АККУМУЛИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ МЕМБРАН
ЛИМФОЦИТОВ**
(экспериментальное исследование)

03.00 01 - радиобиология
03 00.13 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук



Санкт-Петербург
2008

Работа выполнена в Научно-исследовательском испытательном центре (медико-биологической защиты) Федерального государственного учреждения «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ» и в Институте физиологии им И П Павлова РАН

Научные руководители доктор медицинских наук, профессор
Галеев Игорь Шарифович
доктор биологических наук, профессор
Бигдай Елена Владимировна

Официальные оппоненты доктор медицинских наук, профессор
Смирнов Николай Алексеевич,
доктор медицинских наук профессор
Чурина Светлана Константиновна

Ведущая организация ФГУ «Российский научный Центр радиологии и хирургических технологий Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи»

Защита состоится «24» X 2008 года в 13 часов
на заседании диссертационного совета Д 215 002 11 ВМедА «Военно-медицинская академия имени С М Кирова МО РФ» (194044, Санкт-Петербург, ул академика Лебедева, д 6)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Военно-медицинской академии имени С М Кирова

Автореферат разослан «4» VII 2008 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

И Б Ищенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность: Лимфопения – одно из наиболее ранних гематологических проявлений лучевого поражения. Хотя патогенетическая значимость ранней лимфопении в развитии лучевого поражения менее очевидна в сравнении с миелодепрессией, тем не менее даже само наличие линейной зависимости между степенью уменьшения количества лимфоцитов и величиной поглощенной дозы позволяет предполагать, что указанный гематологический феномен играет определенную роль в дальнейшем течении патологического процесса, индуцированного воздействием ионизирующей радиации.

В последние годы убедительно показано, что некоторые цитокины и ростовые факторы, препятствующие гибели лимфоцитов после облучения, оказывают отчетливый противолучевой эффект (Пол У 1988).

В отличие от количественных закономерностей изменений числа лимфоцитов в зависимости от дозы радиационного воздействия, которые изучены довольно подробно, влияние облучения на функциональное состояние этих клеток исследовано явно недостаточно. Между тем этот вопрос представляет не только теоретический интерес, но и имеет важное прикладное значение для целенаправленной разработки средств ранней патогенетической терапии острой лучевой болезни (ОЛБ).

Данные, ранее проведенных исследований, позволяют предполагать, что снижение количества лимфоцитов после облучения связано с нарушением структуры и функции клеточных мембран (Иванов И И, Тарусов Б Н, 1976, Зенков Н К, Мешичкова Е Б, Шергин С М, 1993, Плужников Н И, Чиж С И, Юзвинкевич Л С и др 2000), причем важную роль в этих процессах играет оксидантный стресс, проявляющийся в резком усилении продукции активных кислородных метаболитов (АКМ) (супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород и др), оксидов азота (монооксид азота, пероксинитрит), инициации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Алесенко А В, 1981, Барабой В А, Олейник С А 1999, Кудряшов Ю Б, Гончаренко Е Н 1970). Действие активных форм кислорода (АФК) оказывает модифицирующий эффект на клеточные мембраны с нарушением синтеза АТФ и транспорта ионов, в частности, ионов кальция. Роль ионов кальция в регуляции внутриклеточных процессов показана многими авторами (Самойлов В О 1983, Самойлов В О, Соловьев В Н, Гурская Н Г и др 1980).

Известно, что повышение концентрации цитозольного кальция приводит к образованию комплекса кальций-хлортетрациклин-клеточная мембрана с цитозольной стороны мембраны и увеличению количества связанной с ней флуоресцирующей формы (Самоилов В О 1983, Самойлов В О, Лисовский В А, Щедрунов В В, Барский И Я 1984). В качестве дейо для ионов кальция, помимо эндоплазматического

ретикулума, выступают и митохондрии. Захват митохондриями кальция из цитоплазмы – такая же важная функция, как и окислительное фосфорилирование. Если захват ионов кальция митохондриями увеличивается, то уменьшается выход АТФ, а при снижении захвата кальция увеличивается выход АДФ, что свою очередь может быть причиной снижения кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов (Евдотненко Ю В, Зинченко В П 1979, Лейкин Ю Н, Виноградов А Д 1974, Меерсон Ф З 1981, Aguoma Okezie I 1998). В то же время, данных об изменении кальций-аккумулирующей способности и активности дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов прижизненными методами люминесцентного анализа у животных, подвергнутых гамма-облучению, в литературе обнаружить не удалось.

Недостаточная изученность этих вопросов и обусловила актуальность настоящей работы, посвященной исследованию механизмов повреждающего действия ионизирующих излучений на клетки лимфоидной ткани, в частности, оценке влияния γ -облучения на кальций-аккумулирующую способность мембран и клеточное дыхание лимфоцитов, что имеет важное теоретическое и практическое значение для радиобиологии и военной медицины.

Целью работы явилось экспериментальное изучение ранних пострadiaционных изменений кальций-аккумулирующей способности, нарушения митохондриального дыхания лимфоцитов и роли оксидативного стресса в механизмах их возникновения.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить дозозависимые закономерности пострadiaционных изменений кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов при различных вариантах радиационного воздействия.
2. Оценить влияние радиозащитных средств на кальций-аккумулирующую способность мембран лимфоцитов.
3. Исследовать влияние радиационного воздействия на митохондриальное дыхание лимфоцитов.
4. Изучить состояние процессов свободнорадикального окисления в ранние сроки после гамма-облучения и их возможную роль в механизмах ранних послучевых нарушений кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования.

Установлено, что в первые минуты после облучения крыс в дозах, вызывающих костномозговую форму острой лучевой болезни, отмечается увеличение кальций-аккумулирующей способности лимфоцитов, сменяющееся ее нормализацией, либо снижением, наиболее выраженным при облучении в дозе, соответствующей СД_{50/30}.

Впервые показано, что степень снижения кальций - аккумулярующей способности мембран лимфоцитов прямо пропорциональна тяжести лучевого поражения. Установлено, что снижение кальций-аккумулярующей способности мембран лимфоцитов происходит при воздействии на крыс стрессорных факторов нелучевой природы (депривация сна истощающая физическая нагрузка, гипертермия, иммобилизационный стресс), однако эти изменения выражены значительно в меньшей степени, чем при воздействии летальных доз облучения.

Получены данные, свидетельствующие, что профилактическое введение крысам радиозащитных средств - цистамина и нафтизина способствует восстановлению кальций-аккумулярующей способности лимфоцитов.

Новыми являются данные, указывающие, что облучение животных в дозах, вызывающих костномозговую форму острой лучевой болезни, сопровождается выходом ионов кальция из эндоплазматического ретикула. Это свидетельствует о том, что причиной увеличения кальций-аккумулярующей способности лимфоцитов в первые минуты после облучения является повышение концентрации внутриклеточного кальция, связанное с нарушением функции Ca^{2+} - АТФазы эндоплазматического ретикула.

Впервые получены данные, указывающие на то, что облучение животных в дозах, вызывающих костномозговую форму острой лучевой болезни, сопровождается ранней активацией клеточного дыхания лимфоцитов и проявляется снижением уровня собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов и окисленных флавопротеидов. Это обстоятельство позволяет полагать, что ионизирующее излучение изменяет окислительно-восстановительное состояние переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий.

В работе показано, что уже в первые минуты после облучения в костномозговом диапазоне доз в плазме крови облученных крыс развиваются изменения процессов свободнорадикального окисления, характерные для окислительного стресса (возрастает содержание окисленного триптофана, уровень карбонильных производных, снижается количество α -токоферола и битирозина). Совпадение во времени этих изменений и нарушений кальций - аккумулярующая способность мембран лимфоцитов может указывать на один из возможных механизмов ранних пострадиационных изменений кальций-аккумулярующей способности лимфоцитов.

Практическая значимость работы.

Разработаны экспериментальные модели для изучения ранних пострадиационных нарушений функции клеточных мембран на основе прижизненного флуоресцентного анализа их кальций-аккумулярующей

способности Уточнены количественные закономерности изменения этого показателя при различных вариантах радиационного воздействия у мелких лабораторных животных Получены данные, свидетельствующие о целесообразности дальнейшего изучения указанного показателя для оценки эффективности средств профилактики и лечения лучевых поражений в эксперименте

Положения, выносимые на защиту

1 Облучение животных сопровождается ранним увеличением кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов Этот эффект обусловлен выходом ионов кальция из эндоплазматического ретикулума

2 Облучение животных в дозах, вызывающих костномозговую форму острой лучевой болезни, сопровождается ранней активацией клеточного дыхания лимфоцитов

3 Пострадиационное снижение кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов может быть связано с активацией процессов свободнорадикального окисления

Апробация и внедрение результатов работы

Исследования выполнялись в соответствии с плановой тематикой научно-исследовательских работ НИИЦ (МБЗ) ГНИИИ ВМ МО РФ с января 2003 г по декабрь 2005 г, его результаты реализованы в отчетах по теме НИР «Экспериментальное обоснование использования маркеров оксидативного стресса для ранней индикации радиационных поражений» Результаты исследований доложены на заседаниях секции № 1 НТС НИИЦ (МБЗ) ГНИИИ ВМ МО РФ (протокол № 2 от 16 февраля 2005 г), на Российской научной конференции «Медико-биологические проблемы прогнотической и противохимической защиты» (Санкт-Петербург, 2004 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных результатов, обсуждения, выводов и списка литературы В диссертации представлены 12 рисунков и 16 таблиц Список литературы содержит 145 библиографических источников из них 84 отечественных и 61 иностранных публикаций

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты выполнены на 630 белых беспородных крысах-самцах, массой 180 - 220 г До начала опытов животные находились в условиях стационарного содержания в виварии не менее 7 сут Для

получения радиационных поражений животных подвергали гамма - облучению в диапазоне доз от 0,5 до 7,5 Гр

Крыс подвергали общему равномерному однократному гамма-облучению в дозах, вызывающих костно - мозговую форму острой лучевой болезни. Исследование периферической крови у животных проводили через 3 мин, 3, 6 и 24 ч после облучения.

Неравномерное γ - облучение моделировали с коэффициентом неравномерности голова-глаз 3,3 в дозе 20,0 Гр с экранированием свинцовыми пластинами туловища животных. Под экраном одновременно фиксировали 4 станка (один над другим). Туловище крыс экранировали при помощи свинцового кожуха толщиной 8 мм по бокам и с торцов станка, с учетом величины тени. Дозиметрический контроль осуществляли с помощью дозиметров Д-500. Исследования периферической крови у животных проводили через 6 ч после неравномерного облучения.

Сочетанные лучевые поражения моделировали в варианте сочетания рентгеновского ожога III-6 степени с общим облучением животных от источника гамма-излучения.

Комбинированные радиационно-механические поражения у облученных животных моделировали путем перелома диафиза бедренной кости в средней трети. Перелом бедренной кости осуществляли под внутривенной анестезией. Достоверными признаками перелома являлись патологическая подвижность в зоне перелома, крепитация костных отломков, анатомическое укорочение бедра и нарушение двигательной функции. После перелома бедренной кости животным осуществлялся интрамедуллярный остеосинтез спицей Киршнера.

Для моделирования воздействия повышенной температуры окружающей среды животных помещали в термокамеру, сконструированную на базе термостата, где обеспечивалась достаточная вентиляция воздуха и доступ животных к воде. В камере поддерживалась заданная температура и относительная влажность воздуха на уровне 30 - 50 %. Визуально контролировалась двигательная активность и поведение животных внутри камеры.

Для моделирования психоэмоциональных перегрузок методом депривации сна крыс помещали по одной в отсеке решетчатой клетки (размером 200x150x150 мм) установленной на поддон с водой комнатной температуры. В отсеки клетки были вмонтированы жердочки (диаметром 10 мм), расположенные на 100 мм выше пола клетки. Пол заливали водой, высота водяного столба 4 см. Животные находились в решетчатой клетке в течение 48 ч. Один раз в сутки животных извлекали для кормления.

Истощающую физическую нагрузку в опытах на крысах моделировали методом многоскоростного плавания до отказа, при этом относительное приращение продолжительности очередного проплыва

дистанции по сравнению с предыдущим уменьшалась в 3-4 раза в конце теста

Для моделирования иммобилизационного стресса передние и задние конечности крыс фиксировали медицинским бинтом на деревянном станке (размером 430x145 мм) на 2 ч

Для решения поставленных задач применяли прижизненный флуоресцентный анализ мембранно-связанного кальция в лимфоцитах, а также прижизненный флуоресцентный анализ активности дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов

Прижизненный анализ кальций-аккумулирующей способности клеточных мембран имеет ряд преимуществ по отношению к другим методам исследования, к которым относится, высокая чувствительность, неинвазивность и малая инерционность (Владимиров Ю А, Коган Э М, Коркина Л Г, и др 1978, Карнаузов В И 1977)

Зондом для регистрации мембранно-связанного кальция клеток является хлоргетрациклин, с помощью которого можно изучать клеточные процессы на целых тканях и в клетках – как изолированных, так и *in situ* (Владимиров Ю А, Коган Э М, Коркина Л Г, Сороковой В И 1978)

Лимфоциты выделяли из периферической крови животных в градиенте плотности фикола – верографина при инкубации в термостате при $t = 37^{\circ} \text{C}$ в течение 40 мин. После трех - кратного центрифугирования при 1500 об/мин в течение 3-х мин клетки инкубировали в 25 мкМ растворе хлоргетрациклина, приготовленном на растворе Рингера для теплокровных животных, при $t = 37^{\circ} \text{C}$ в течение 30 мин, а затем помещали в камеру Горяева на предметном столике под объективом микроскопа. Для выделения возбуждающей флуоресценцию длины волны с максимумом на 390 нм применяли светофильтры (ЛОМО, Россия). Интенсивность флуоресценции регистрировали на длине волны 520 нм от одиночных клеток, что позволяло в одном эксперименте получать большой статистический материал. Световой сигнал от каждой из 20 клеток поступал на фотоэлектронный умножитель, а затем через аналого-цифровой преобразователь – в компьютер

Для изучения причины увеличения кальций - аккумулирующей способности мембран лимфоцитов использовали раствор тапсигаргина (100 нМ) - ингибитора Ca^{2+} - АТФазы эндоплазматического ретикулама, вызывающего пассивную мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо независимо от активации рецепторов и генерации специфических инозитолфосфатов. Тапсигаргин применяли для прямого исследования емкостного входа ионов Ca^{2+} . Возникновение реакции под действием тапсигаргина, сходной с таковой под влиянием действия физических и химических факторов, свидетельствует о том, что вход Ca^{2+} в клетку обусловлен опустошением кальциевых депо. В экспериментах были использованы реактивы фирмы Sigma (Швейцария)

Посредством анализа собственной флуоресценции можно решать задачи, связанные с изучением внутриклеточной регуляции обмена веществ и энергии (Лукьянова Л Д, Балмуханова Б С, Уголев А Т 1982) В свою очередь, реакции дыхательной цепи – терминального этапа биологического окисления, являются интегральным показателем динамики обмена веществ Метод прижизненного люминесцентного анализа клеточного дыхания позволяет изучать изменения клеточного метаболизма Среди реакций существенную роль могут играть изменения активности дыхательной цепи митохондрий, вызванные действием ионизирующего излучения (Moller J V, Anderson J R, Maize M 1981)

Максимум интенсивности собственной флуоресценции НАДН находится в области спектра от 455 до 480 нм При окислении НАДН теряет способность люминесцировать.

Не менее важно оценить вклад гликолитического и митохондриального НАДН в суммарную флуоресценцию Согласно имеющимся экспериментальным данным, вклад второго пула в общий сигнал почти в 10 раз выше, чем цитоплазматического (Glasovny E, Grasso A 1966) Таким образом, в лимфоцитах синюю флуоресценцию в клетках главным образом обеспечивают никотинамидинуклестиды митохондрий

Окисленным флавопротендам свойственна собственная флуоресценция на длине волны 520 - 530 нм, которая обусловлена рибофлавином При восстановлении флавопротенды теряют способность люминесцировать Активность дыхательной цепи митохондрий в лимфоцитах исследовали методом прижизненной флуоресцентной микроскопии

Интенсивность флуоресценции восстановленных пиридиннуклестидов и окисленных флавопротеннов лимфоцитов оценивали на микроскопе ЛЮАМ-Р8 (ЛОМО, Россия)

Достоинством микроскопа ЛЮАМ-Р8 является то, что он позволяет одновременно измерять собственную флуоресценцию пиридиннуклестидов и окисленных флавопротеннов в реальном времени Излучение этих компонентов дыхательной цепи, проходя через монохроматор и свой фотоэлектронный умножитель, усиливается и преобразовывается в электрические сигналы, которые регистрируются на мониторе компьютера

Таким образом, анализ собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклестидов и окисленных флавопротеннов лимфоцитов облученных крыс позволяет решать поставленные задачи, связанные с изучением метаболической активности дыхательной цепи митохондрий

Состояние общей антиоксидантной активности системы, определение общей оксидантной активности, концентрацию SS- и SH-

групп и α -токоферола, окислительную модификацию белков определяли по содержанию общего белка, карбонильных производных, триптофана, битирозина и нитратов в плазме крови облученных животных определяли по стандартным методикам

В работе использованы радиопротекторы нафтизин и цистамин

Раствор нафтизина вводили внутривентриально за 15 мин до воздействия

Раствор цистамина вводили внутривентриально 20 мин до воздействия Исследование периферической крови проводили через 6 ч после воздействия

Статистическую обработку результатов проводили с помощью t – критерия Стьюдента для сравнения средних значений Вероятность $P < 0,95$ считали достаточной для вывода о существенности выявленных различий

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка кальций - аккумулярующей способности мембран лимфоцитов крыс при различных вариантах γ -облучения

Установлено, что равномерное облучение животных в дозах 0,5 – 7,5 Гр (через 3 мин после облучения) вызывает достоверное увеличение суммарной интенсивности флуоресценции комплекса «кальций – хлортетрациклин - клеточная мембрана» с последующим снижением ниже контрольного уровня через 3 ч после облучения животных в дозах 6,75 и 7,5 Гр Увеличение кальций-аккумулярующей способности мембран лимфоцитов в последующие сроки сменялось нормализацией показателя или постепенным его снижением, наиболее выраженным при облучении крыс в высоких (6,75 и 7,5 Гр) дозах

Важно отметить, что кальций-аккумулярующая способность мембран лимфоцитов отражает функциональное состояние клеток и не зависит от общего количества лимфоцитов в периферической крови животных

Для более точного анализа изменений кальций-аккумулярующей способности лимфоцитов условно введены такие понятия, как лимфоциты с «высокой» (65 - 70 усл ед) «сниженной» (ниже 45 усл ед) и «нормальной» (45 - 50 усл ед) флуоресценцией Снижение количества «нормальных» лимфоцитов в периферической крови животных регистрировалось в диапазоне доз облучения от 0,5 до 7,5 Гр, причем значимые и статистически достоверные различия в значениях показателя отмечались уже через 6 ч после облучения

Из рисунка 1 видно, что в первые минуты-часы после облучения в дозах 0,5 - 3,0 Гр и в первые минуты после облучения в дозах 6,75 - 7,5 Гр снижение количества лимфоцитов с «нормальной» флуоресценцией происходит за счет увеличения числа клеток с «высокой» флуоресценцией, тогда как в более поздние сроки в периферической крови животных

преобладают лимфоциты с «низкой» (ниже 45 отн ед) флуоресценцией (рис 2)

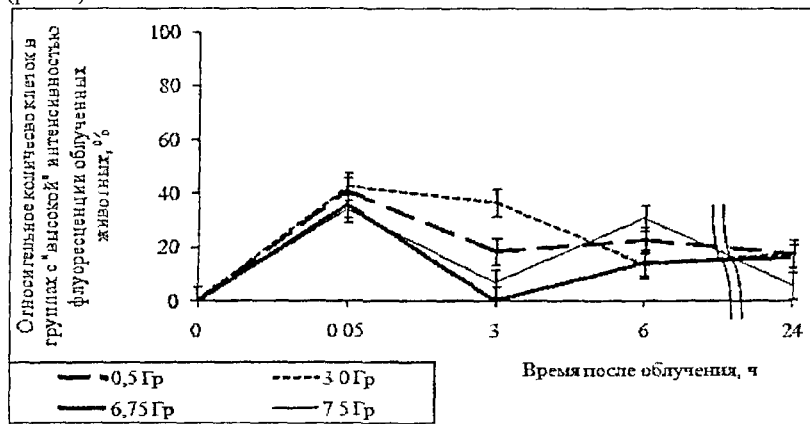


Рисунок 1 - Относительное количество лимфоцитов с «высокой» интенсивностью флуоресценции у крыс, облученных в различных дозах

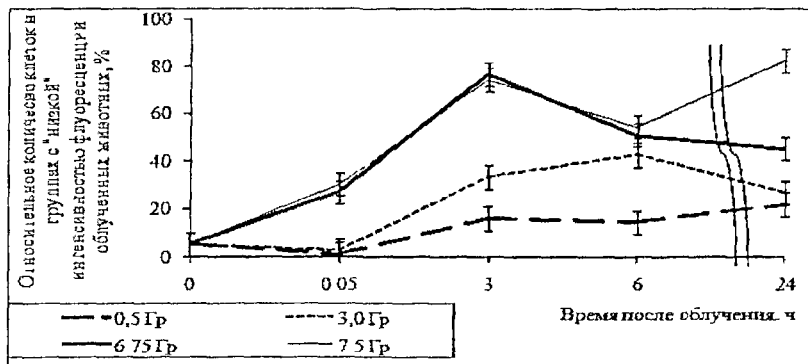


Рисунок 2 - Относительное количество лимфоцитов с «низкой» интенсивностью флуоресценции у крыс, облученных в различных дозах

Как видно из рисунка 3, снижение количества «нормальных» лимфоцитов в периферической крови животных регистрировались в диапазоне доз облучения от 0,5 до 7,5 Гр, причем значимые и статистически достоверные различия отмечались через 6 ч после облучения

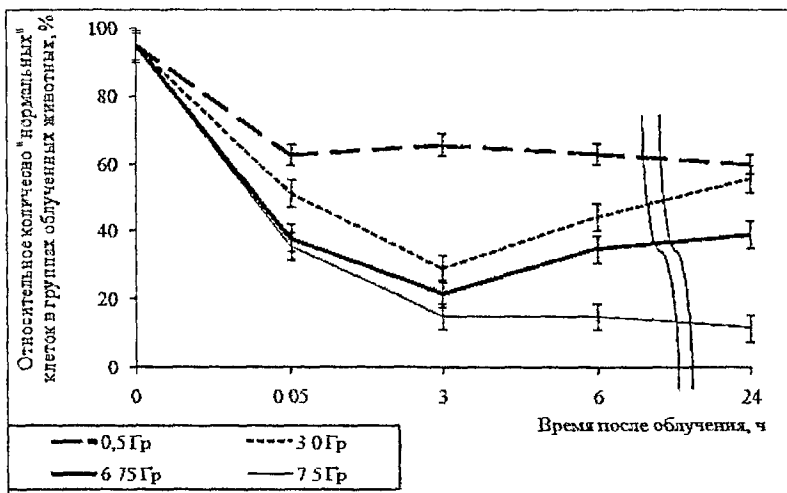


Рисунок 3 – Относительное количество «нормальных» лимфоцитов в периферической крови у крыс, облученных в различных дозах

Таким образом, снижение количества «нормальных» лимфоцитов в периферической крови облученных животных через 6 ч после воздействия было обусловлено количеством клеток со сниженной кальций-аккумулирующей способностью

Повышение кальций-аккумулирующей способности лимфоцитов облученных животных в первые часы после облучения обусловлено увеличением содержания ионов кальция в цитозоле, что соответствует данным, полученным другими авторами В частности, в работе (Шевченко А С, Габай В Л, Кобялко В О, Макарова Ю М, Шевченко Т С 1997, Ярили А А 1996) показано, что через 1,5 – 3,5 ч после облучения тимоцитов мышей в дозе 5 Гр отмечается резкое увеличение проницаемости клеточной мембраны для ионов кальция Избыток ионов кальция в клетках инициирует процесс фрагментации ДНК Выявленное в этот период накопление ионов кальция в облученных тимоцитах мышей является одной из причин активации Ca^{2+} - зависимой эндонуклеазы (Шевченко А С, Габай В Л, Кобялко В О, Макарова Ю М, Шевченко Т С 1997, Ярили А А 1996) Кроме того, избыточное содержание ионов кальция в клетке может оказывать прямое цитотоксическое действие Установлено, что через 3,5 – 5 ч после облучения тимоцитов в дозе 5 Гр, фрагментация ДНК и перегрузка внутриклеточных пулов ионами кальция

приводит к гибели клеток (Шевченко А С, Габай В Л, Кобялко В О, Макарова Ю М, Шевченко Т С 1997, Ярилин А А 1996)

Установлено, что интенсивность флуоресценции комплекса «кальций – хлортетрациклин - клеточная мембрана» лимфоцитов при неравномерном облучении животных через 6 ч составила $39,5 \pm 1,6$ отн ед, а количество «нормальных» клеток - на уровне $49,2 \pm 5,4$ % от исходного, в то время как при общем равномерном гамма – облучении в той же дозе (20 Гр) интенсивность флуоресценции комплекса «кальций – хлортетрациклин - клеточная мембрана» лимфоцитов была значительно выше и составила $100,1 \pm 8,1$ усл ед, а количество «нормальных» клеток снижалась до $10,8 \pm 1,5$ %

Таким образом, степень снижения интенсивности флуоресценции коррелировала с тяжестью течения лучевой болезни (при общем равномерном γ - облучении средняя продолжительность жизни крыс составила $7,5 \pm 1,5$ сут, тогда как средняя продолжительность жизни погибших животных, подвергнутых неравномерному облучению, составила $14 \pm 1,5$ сут)

Изучение кальций-аккумулирующей способности лимфоцитов при других вариантах радиационного воздействия (неравномерном γ - облучении, комбинированном и сочетанном лучевых поражениях) показало, что при неравномерном γ – облучении (в дозе 20 Гр) количество «нормальных» лимфоцитов в периферической крови облученных животных в 4,5 раза выше, чем при равномерном облучении в той же дозе

Таким образом, можно утверждать, что степень снижения количества «нормальных» клеток является важным показателем тяжести острой лучевой болезни

При сочетании общего равномерного γ - облучения в дозе 6,75 Гр и рентгеновского ожога 10 % поверхности тела животных отмечалось более тяжелое течение острого лучевого поражения у крыс, что сопровождалось резким снижением количества «нормальных» лимфоцитов (до 25 % при 100 % гибели животных) В случае изолированного γ – облучения животных в дозе 6,75 Гр число «нормальных» лимфоцитов составило 37,6 % относительно исходного уровня, а летальность - 50 %

Комбинированное поражение (перелом бедренной кости и общее облучение в дозе 6,75 Гр) вызывало снижение числа «нормальных» лимфоцитов до 25 % относительно исходного уровня, при этом летальность составила 67 % Как указывалось выше, равномерное γ - облучение сопровождалось 50 % гибелью животных и снижением числа клеток с «нормальной» флуоресценцией до 38 % относительно исходного значения

Более легкие поражения (изолированный перелом бедра или локальный рентгеновский ожог 10 % поверхности кожи животных) сопровождалось снижением количества «нормальных» лимфоцитов до

уровня, наблюдаемого при общем равномерном γ - облучении в дозе 3,0 Гр

Следовательно, полученные данные об изменении кальций-аккумулирующей способности лимфоцитов свидетельствуют о корреляции этого показателя с общей тяжестью лучевого поражения чем выше летальность, тем больше снижается количество «нормальных» тимфоцитов в крови облученных животных

Из полученных данных можно заключить, что показатель «количество нормальных клеток» является ранним прогностическим признаком тяжести ОЛБ при равномерном, неравномерном γ – облучении, а также комбинированном и сочетанном лучевых поражениях

Изучение специфичности измененной кальций - аккумулярующей способности мембран лимфоцитов

С целью оценки специфичности пострадиационных изменений кальций-аккумулирующей способности лимфоцитов, было изучено влияние на этот показатель стрессорных факторов нелучевой этиологии (депривация сна, истощающая физическая нагрузка, гипертермия, иммобилизационный стресс) Воздействие различных факторов нерадиационной природы вызывало увеличение интенсивности флуоресценции комплекса «кальций – хлоргетрациклин - клеточная мембрана» лимфоцитов периферической крови крыс на 40 % выше исходного уровня, что свидетельствовало об увеличении кальций-аккумулирующей способности лимфоцитов При этом число «нормальных» лимфоцитов снижалось на 20 - 35 % по сравнению с исходным уровнем Близкие результаты были получены в группах животных, подвергнутых общему равномерному облучению в дозах 0,5 - 3,0 Гр

Таким образом, увеличение кальций-аккумулирующей способности лимфоцитов крыс неспецифично и возникает при воздействии различных неблагоприятных факторов, имеющих стрессовый характер Аналогичные данные приведены в работе (Шевченко А С, Габай В Л, Кобялко В О, Макарова Ю М, Шевченко Т С 1997), где показано, что у мышей, подвергнутых длительному стрессовому воздействию в течении 24 ч, отмечалось увеличение части разрывов ДНК в тимоцитах и увеличение МДА в сыворотке крови, сопоставимое с эффектами облучения животных в дозах 50 - 60 рад

Влияние радиозащитных средств на кальций-аккумулирующую способность мембран лимфоцитов крыс, подвергнутых равномерному γ -облучению

Применение нафтизина и цистамина в радиозащитных дозах вызывало увеличение количества «нормально» флуоресцирующих клеток в 2 раза по сравнению с облученным контролем При этом у животных, подвергнутых облучению в дозе 7,5 Гр, количество «нормальных»

лимфоцитов периферической крови увеличилось до уровня, наблюдаемого при γ - облучении животных в дозе 6,75 Гр. Это позволяет полагать, что одной из возможных мишеней специфического действия радиопротекторов является защита мембран лимфоцитов от атаки свободных радикалов в облученном организме.

Полученные данные свидетельствуют, что показатель «количество нормальных лимфоцитов» может быть использован в качестве метода оценки эффективности средств профилактики лучевых поражений.

Изменение кальций - аккумулярующей способности мембран лимфоцитов в облученной суспензии

На фоне действия тапсигаргина интенсивность флуоресценции комплекса «кальций - хлортетрациклин - клеточная мембрана» увеличивалась и достигала значений $72,0 \pm 8,4$ усл. ед. (такого же уровня достигает свечение суспензии лимфоцитов, облученных в дозе 7,5 Гр). Равенство реакций на тапсигаргин и облучение свидетельствует, по-видимому, об одинаковом механизме, лежащем в основе увеличения интенсивности флуоресценции комплекса «кальций - хлортетрациклин - клеточная мембрана». Следовательно, увеличение интенсивности флуоресценции комплекса «кальций - хлортетрациклин - клеточная мембрана» в облученной суспензии лимфоцитов происходит за счет выхода ионов кальция из эндоплазматического ретикулума.

Таким образом, увеличение кальций - аккумулярующей способности мембран лимфоцитов периферической крови облученных животных происходит за счет выхода ионов Ca^{+2} из эндоплазматического ретикулума.

Влияние радиационного воздействия на митохондриальное дыхание лимфоцитов крыс

Результаты исследований свидетельствуют (рис. 4), что интенсивность собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов в лимфоцитах периферической крови крыс, облученных в различных дозах, снижается уже через 3 мин после воздействия. Уменьшение светового сигнала в синей области спектра связано со снижением содержания в митохондриях восстановленных пиридиннуклеотидов, что свидетельствует об изменении окислительно-восстановительного состояния начального участка дыхательной цепи митохондрий. Следовательно, облучение вызывает снижение пула восстановленных пиридиннуклеотидов в митохондриях лимфоцитов.

Следует отметить, что эти изменения были достаточно кратковременными и наиболее выраженными после радиационного воздействия в дозах 6,75 - 7,5 Гр. Уровень восстановленных пиридиннуклеотидов восстанавливался и даже несколько увеличивался к исходу 1 сут.

Восстановленная форма пиридиннуклеотидов служит основным донором переноса электронов на флавопротеиды в дыхательной цепи митохондрий. По дыхательной цепи возбужденные электроны переносятся на кислород, постепенно отдавая свою энергию для синтеза молекул АТФ, обеспечивающих биоэнергетику клетки.

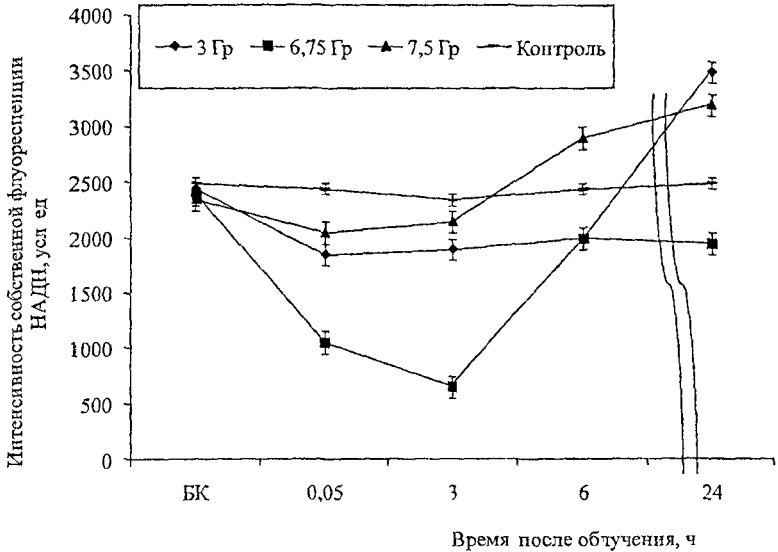


Рисунок 4 - Влияние γ -облучения на интенсивность собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов в лимфоцитах крыс

Данные, характеризующие индуцированные радиационным воздействием изменения собственной флуоресценции окисленных флавопротеидов в лимфоцитах периферической крови крыс, представлены на рис 5

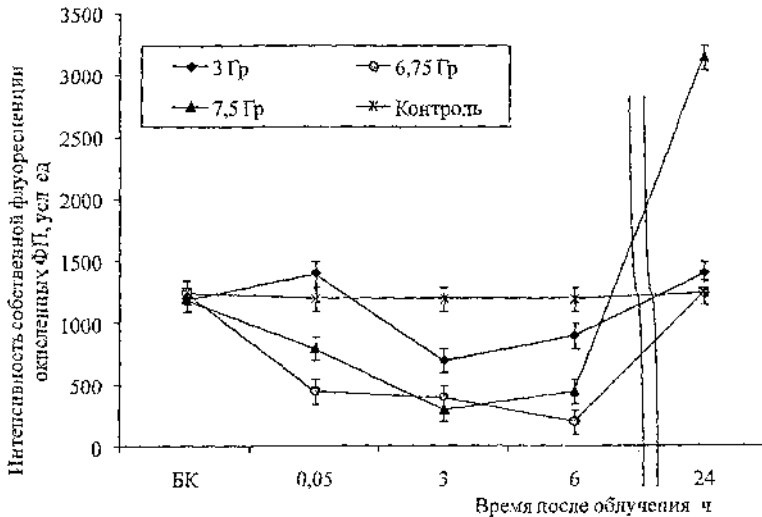


Рисунок 5 - Влияние γ -облучения на интенсивности собственной флуоресценции окисленных флавопротеидов в лимфоцитах крыс

Как видно из рисунка 5, через 3 мин после облучения животных в высоких дозах интенсивность флуоресценции окисленных флавопротеидов достоверно снижалась и сохранялась ниже контрольного значения в течение 6 ч после облучения. Такое изменение собственной флуоресценции указывает на преобладание восстановленных форм флавопротеидов, которые образуются при переносе электронов с восстановленных пиридиннуклеотидов и при этом теряют способность флуоресцировать.

Следовательно, облучение крыс вызывает снижение содержания окисленных форм флавопротеидов в митохондриях лимфоцитов, т.е. изменяет окислительно-восстановительное состояние переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий.

В этой связи можно предполагать, что полученные данные об изменении активности ферментов начального участка дыхательной цепи митохондрий могут свидетельствовать о постлучевой активации клеточного дыхания.

Таким образом, можно полагать, что увеличение кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов и активация ферментов начального участка дыхательной цепи митохондрий

лимфоцитов является результатом усиления окислительных процессов в облученном организме

Состояние процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты плазмы крови при лучевом поражении от общего равномерного γ -облучения

В последние годы возрос интерес исследователей направлен к изучению начальной стадии радиационных поражений - свободнорадикальным реакциям, активация которых приводит к развитию "окислительного стресса" (Алесенко А В, 1981, Барабой В А, Олейник С А 1999, Плужников Н Н, Чиж С И, Юзвинкевич Л С 2000, Зозуля Ю А, Барабой В А, Суковой Д А 2000)

Известно, что окислительный стресс наблюдается при различных экстремальных воздействиях и патологических состояниях и является неотъемлемой частью патогенеза радиационного поражения. Свободные радикалы, образующиеся в результате прямого действия излучения на молекулы-мишени или в результате взаимодействия молекул биосубстрата с продуктами радиолиза воды, иницируют и активируют перекисное окисление липидов, что приводит к повреждению клеточных мембран

Результаты исследований, представленные в работе, позволяют утверждать, что в первые минуты - часы после радиационного воздействия у живогных, облученных в костномозговом диапазоне доз, происходит снижение общей антиоксидантной активности, что проявляется в увеличении концентрации SS-групп, снижении SH-групп и эндогенного α -токоферола (табл 1)

Таблица 1

Показатели общей антиоксидантной системы плазмы крови крыс через 3 мин после γ - облучения в различных дозах ($M \pm m$, $n=12$)

Показатель	До облучения (контроль)	После облучения в дозах, Гр		
		0,5	3,0	6,75
ОАА, усл ед	55,2 \pm 2,3	94,8 \pm 9,20*	125,7 \pm 6,60*	160,2 \pm 5,10*
Концентрация SS-групп, мкмоль/л	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02*
Концентрация SH-групп, мкмоль/л	0,33 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02*	0,34 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02
Содержание α токоферола, мкмоль/л	13,0 \pm 0,3	9,3 \pm 0,3*	8,8 \pm 0,2*	7,5 \pm 0,3*

*- различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем

На этом фоне общая оксидантная активности плазмы крови облученных животных увеличивается (табл 2)

Таблица 2

Показатель общей оксидантной активности плазмы крови крыс через 3 ч после γ - облучения в различных дозах (($M \pm m$, n=12)

Показатель	До облучения (контроль)	После облучения в дозах, Гр		
		0,5	3,0	6,75
Общая оксидантная активность, %	57±6	72±4*	75±3*	79±4*
*-различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с уровнем до облучения				

Как видно из табл 2, через 3 ч после радиационного воздействия у животных отмечается достоверное увеличение общей оксидантной активности плазмы крови (на 20-25 % от исходного уровня) на всем регистрируемом диапазоне доз

В этот же срок в плазме крови облученных животных изменяется окислительная модификация белков, что сопровождается увеличением количества окисленного гриптофана, карбонильных производных и снижением количества окисленного тирозина. В последующем отмечается увеличение антиоксидантной активности плазмы крови, что регистрируется в реакции ингибирования окисления твинна-80, в реакции с рибофлавином, ДФПГ

Можно предположить, что процессы свободнорадикального окисления в облученном организме животных, протекают не только в плазме крови, но и в клетках лимфоидной ткани с последующей модификацией мембран лимфоцитов

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что под влиянием ИИ изменяется концентрация ионов кальция в цитозоле лимфоцитов. Это приводит, с одной стороны, к активации дыхательных ферментов, связанных с синтезом АТФ, с другой – усиленно процессов ПОЛ и дальнейшим нарушением структуры внутриклеточных мембран, в частности митохондрий. Изменение кальций - аккумулярующей способности мембран лимфоцитов как в сторону увеличения, так в сторону снижения может быть пусковым сигналом к инициации апоптоза лимфоцитов, что имеет важное значение в патогенезе лучевого поражения организма

ВЫВОДЫ

1 В первые минуты после γ - облучения крыс в дозах 0,5 – 7,5 Гр отмечается увеличение кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов (на 20 - 40 % по сравнению с контролем), что свидетельствует об увеличении концентрации ионов кальция в лимфоцитах. В последующие сроки наблюдения, отмечается либо нормализация (0,5 – 3,0 Гр), либо значительное снижение кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов, достигающее минимального значения при облучении в дозе 7,5 Гр (6 – 24 ч после радиационного воздействия).

2 При неравномерном кранио-каудальном γ - облучении крыс в дозе 20 Гр в первые часы после воздействия отмечается увеличение концентрации ионов кальция в лимфоцитах в 2 раза и снижение количества лимфоцитов с «нормальной» флуоресценцией в 5 раз по сравнению с необлученным контролем.

3 В первые часы после сочетанного лучевого поражения, включающего рентгеновский ожог 10 % поверхности тела крыс и общее облучение в дозе 6,75 Гр, отмечается снижение количества лимфоцитов с «нормальной» флуоресценцией в 4 раза по сравнению с необлученным контролем и в 1,8 раза по сравнению с изолированным облучением в аналогичной дозе.

4 Комбинированное лучевое поражение крыс, включающее перелом бедренной кости и общее облучение в дозе 6,75 Гр, сопровождается уменьшением количества лимфоцитов с «нормальной» флуоресценцией в 4 раза по сравнению с необлученным контролем.

5 При воздействии на крыс факторов нелучевой природы (депривация сна, истощающая физическая нагрузка, гипертермия и иммобилизационный стресс) наблюдается снижение количества лимфоцитов с «нормальной» флуоресценцией на 20 - 35 % по сравнению с контролем. Эти сдвиги значительно менее выражены по сравнению с воздействием γ - облучения в летальных дозах.

6 Профилактическое введение крысам радиозащитных средств цистамина и пафизина способствует снижению повреждающего действия облучения в отношении кальций-аккумулирующей способности мембран лимфоцитов.

7 Облучение животных в дозах, вызывающих костно-мозговую форму острой лучевой болезни, сопровождается увеличением выхода ионов кальция из эндоплазматического ретикулума, что является, по-видимому, основной причиной увеличения содержания ионов кальция в лимфоцитах.

8 Облучение животных в дозах, вызывающих костно-мозговую форму острой лучевой болезни, сопровождается ранней активацией клеточного дыхания лимфоцитов, что проявляется снижением уровня собственной люминесценции восстановленных пиридиннуклеотидов на 40 – 60 % и окисленных флавопротеидов на 40 – 50 % по отношению к контролю.

9 В первые минуты после облучения крыс в дозах от 0,5 Гр до 6,75 наблюдаются сдвиги процессов свободнорадикального окисления в плазме крови, которые характерны для окислительного стресса (возрастает содержание окисленного триптофана в 1,3 раза, уровень карбоксильных производных в 2 раза, снижается количество α -токоферола на 30 %) Эти нарушения могут явиться одним из возможных механизмов постлучевого снижения кальции – аккумулярующей способности мембран лимфоцитов

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1 Показатель кальций-аккумулярующей способности лимфоцитов может быть использован в качестве метода оценки тяжести лучевых поражений в дозах, вызывающих костномозговую форму острой лучевой болезни и эффективности средств их профилактики и лечения

2. Определение собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов и окисленных флавопротеидов в лимфоцитах может быть использовано в качестве метода оценки функционального состояния лимфоидной ткани при воздействии на организм различных экстремальных факторов внешней среды

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

ДИССЕРТАЦИИ:

1 Тихомиров П В, Швыдюк О Н Модификация лучевых поражений истощающей физической нагрузкой // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины / под общ ред Н Н Плужникова – СПб, 2003 – 282 с – (Науч тр НИИЦ (МБЗ) ГосНИИИ военной медицины, Т 4)

2 Антонишкис Ю А, Швыдюк О Н Динамика показателей лейкоцитограммы и ретикулоцитов периферической крови крыс в ранние сроки после облучения // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины / Под общ ред Н Н Плужникова – СПб, 2004 – 315 с – (Науч тр /НИИЦ (МБЗ) ГосНИИИ военной медицины, Т 5)

3 Драчев И С, Галеев И Ш, Родионов Г Г, Швыдюк О Н Экспериментальная оценка возможности использования маркеров оксидативного стресса в целях биологической дозиметрии // Там же.

4 Швыдюк О Н, Галеев И Ш, Бигдай Е В, Тихомиров П В Возможность использования кальций – аккумулярующей способности нейтрофилов и лимфоцитов периферической крови крыс в качестве показателя для ранней индикации радиационных поражений // Там же

5. Галеев И Ш, Легеза В И, Магира В Ф, Швыдюк О Н, Драчев И С. Роль оксидативного стресса в радиационном поражении организма ГосНИИИ ВМ МО РФ, Москва / под ред член – кор РАН и РАМН И Б Ушакова / Механизмы стресса в экстремальных условиях М 2004 165 с

6 Швыдюк О Н, Галеев И Ш, Тихомиров П В, Бигдай Е В Кальций – аккумулярующая способность нейтрофилов и лимфоцитов

периферической крови крыс как ранний биоиндикатор радиационных поражений // Медико – биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты – СПб ООО «Издательство Фоллиант», 2004 – 528 с

7 Швыдюк О Н, Галеев И Ш, Лезега В И, Тихомиров П В, Бигдай Е В, Ладанова Т В Изменения активности дыхательных ферментов митохондрий лимфоцитов периферической крови крыс, подвергнутых радиационному воздействию // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины / под общ ред А В Иванченко – СПб, 2006 – 328 с – (Науч тр / НИИЦ (МБЗ) ГосНИИИ военной медицины, Т 6)

8 Швыдюк О Н, Галеев И Ш, Лезега В И, Тихомиров П В, Бигдай Е В, Ладанова Т В Изменения активности восстановленных пиридиннуклеотидов и окисленных флавопротеидов митохондрий лимфоцитов периферической крови крыс, подвергнутых радиационному воздействию Вестник Российской Военно – Медицинской Академии Приложение № 2005 1 (14) с 178

9 Васильевич С В, Швыдюк О Н, Галеев И Ш, Комлев А Е Влияние поля электрета на кальций – накапливающую способность нейтрофилов у животных, подвергнутых острому лучевому воздействию Там же

10 The experimental evaluation of the state of reduced pyridinynucleotides (NAD H) and oxidated flavoproteides (FP) in rats subjected to radiation exposure

Shvydyk O N, Galeev I Sh, Legeza V I, Tichomirov P V, Bigdai E V, Ladanova T V // XXXVI World Congress on Military Medicine International Cooperation in the Field of Military Medicine PRESENT AND FUTURE // SCIENTIFIC ABSTRACT 5 – 11 June 2005 St Petersburg, Russia 227 – 228 p

11 Швыдюк О Н, Тихомиров П В, Антонишкис Ю А, Бигдай Е В, Ладанова Т В Кальций – накапливающая способность мембран лимфоцитов как критерий оценки тяжести радиационного поражения организма Проблемы диагностики и коррекции состояния здоровья в напряженной экологической среде обитания // Материалы второй международной научной конференции, посвященной 80 – летию со дня рождения академика АМН СССР (РАМН) профессора Г И Сидоренко // под ред профессора Захарченко М П СПб Крисмас+ 2006 – 485 с

Подписано в печать 20.06.08

Объем 1 пл

Тираж 100 экз

Формат 60x84 1/16

Заказ № 479

Типография ВМедА.

194044, СПб, ул Академика Лебедева, 6