

БИОЭФФЕКТЫ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГАЗОВОЙ СМЕСИ И γ -ОБЛУЧЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

С.Н. ЗОЛОТАРЕВА, Ю.Б. ЧЕРКАСОВА, В.В. ЛОГАЧЕВА, С.А. КОСОБУЦКАЯ

*ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.Бурденко»
Министерства здравоохранения России. ул. Студенческая д.10, г. Воронеж, 394036, Россия,
тел. (4732)53-02-93, e-mail: z.vorontsova@mail.ru*

Аннотация. На фоне мощного развития атомной энергетики и часто возникающих природных катаклизмов, сопровождающихся чрезвычайными ситуациями техногенного характера, происходит учащение случаев контакта человека с высокими дозами ионизирующего излучения. В связи с этим остро возникает необходимость обеспечения безопасности населения от радиационных воздействий за счет естественных радиомодификаторов, вызывающих активацию защитных сил организма без привлечения медикаментозных средств. Кишечный эпителий слизистой оболочки тощей кишки является второй «критической» системой, определяющей особенности развития острой лучевой болезни при действии летальных доз ионизирующего излучения. С этих позиций актуальным представляется изучение предшествующего применения гипоксической газовой смеси в качестве модификатора на проявления эффектов γ -облучения по реакции морфологических эквивалентов слизистой оболочки тощей кишки, отражающим состояние обменных процессов, активность транспортных систем и местного гомеостатического равновесия. В эксперименте на белых беспородных половозрелых крысах самцах выявлено повышение резистентности слизистой оболочки тощей кишки в условиях модификации гипоксической газовой смесью. Радиопротективный характер модификатора проявлялся восстановлением процессов пристеночного пищеварения и всасывания, по показателям щелочной и кислой фосфатаз и тенденцией к восстановлению гомеостатического равновесия на местном уровне за счет функциональной активности морфофункциональных типов тучных клеток.

Ключевые слова: γ -облучение, гипоксическая газовая смесь, тонкая кишка, сочетанное действие факторов, модификация, щелочная фосфатаза, кислая фосфатаза, тучные клетки.

BIOEFFECTS OF HYPOXEMIC GAS MIX AND γ -RADIATION IN EXPERIMENT

S.N. ZOLOTAREVA, Y.B. CHERKASOVA, V.V. LOGACHEVA, S.A. KOSOBUTSKAYA

*Voronezh State N.N. Burdenko Medical University, Studentcheskya str., 10, Voronezh, 394036, Russia,
phone: (4732)53 02 93, e-mail: z.vorontsova@mail.ru*

Abstract. Against the backdrop of strong development of nuclear energy and frequently occurring natural disasters with technogenic emergency situations, there is a higher incidence of human exposure to high doses of ionizing radiation. In this regard, there is acute need to ensure the safety of the population from radiation exposures due to natural radiomodifiers causing the activation of the body's defenses without the involvement of drugs. The intestinal epithelium of a mucous membrane of a lean gut is the second «critical» system defining features of development of sharp radiation sickness at action of lethal doses of ionizing radiation. From these positions studying of the previous use of hypoxemic gas mix as the modifier on manifestations of effects of γ -radiation on reaction of morphological equivalents of a mucous membrane of a lean gut, reflecting a condition of exchange processes, activity of transport systems and local homeostatic balance is represented relevant. It was found an increased resistance of the mucous membrane of the jejunum to modify the conditions of hypoxic gas mixture in an experiment on white mongrel adult male rats. Radioprotective character modifier was manifested by restoration process of membrane digestion and absorption, in terms of alkaline and acid phosphatase, and the tendency to restore homeostatic balance at the local level due to the functional activity of morphofunctional types of mast cells.

Key words: γ -radiation, hypoxemic gas mix, jejunum, combined action of factors, modification, alkaline phosphatase, sour phosphatase, mast cells.

Актуальность. В последние десятилетия за счет мощного развития атомной энергетики и часто возникающих природных катаклизмов, сопровождающихся чрезвычайными ситуациями техногенного характера происходит учащение случаев контакта человека с широким диапазоном доз ионизирующего излучения [1,2,6,7,9]. В связи с этим интерес военных медиков и радиобиологов к проблеме обеспечения безопасности населения от радиационных воздействий не только не ослабевает, а увеличивается.

Актуальность данной проблемы в первую очередь связана с необходимостью поиска естественных радиомодификаторов, вызывающих активацию защитных сил организма без привлечения медикаментозных средств. Особое место среди факторов, способных изменять реакцию биологических объектов на радиационное воздействие принадлежит гипоксии. При этом следует подчеркнуть, что ее воздействие оказывает модифицирующий эффект на радиочувствительность и радиорезистентность организма как в сторону повышения, так и в сторону ослабления, вызывая развитие компенсаторно-приспособительных функциональных и морфологических изменений в разных органах и системах, затрагивая в первую очередь клеточные структуры и неразрывно связанные с ними метаболические процессы [3-5]. Кишечный эпителий слизистой оболочки тощей кишки является второй «критической» системой, определяющей особенности развития острой лучевой болезни при действии летальных доз ионизирующего излучения [8, 9]. С этих позиций изучение предшествующего применения гипоксической газовой смеси в качестве модификатора на проявления эффектов γ -облучения в дозе 10 Гр на слизистую оболочку тощей кишки по структурно-функциональным эквивалентам, отражающим состояние обменных процессов, активность транспортных систем и местного гомеостатического равновесия позволит хотя бы частично решить проблему современной радиобиологии в аспекте повышения естественной радиорезистентности тканей.

Цель исследования – оценка эффективности радиомодифицирующего воздействия гипоксической газовой смеси на γ -облучение в дозе 10 Гр по морфологическим эквивалентам определяющим функциональное состояние слизистой оболочки тощей кишки.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 102 белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 220-250 г и начальным возрастом 4 месяца с соблюдением требований хронобиологии. Животных распределяли согласно режимам проведения работы и ее задач на 4 группы. Каждая группа имела четыре временных параметра удаленных от момента воздействия на 1,7; 5; 24 и 72 часа. Таким образом, общее количество групп составило 13.

Первую группу составили животные биологического контроля. Во второй группе животных подвергали однократному воздействию общего *ионизирующего облучения* (ИО) в поглощенной дозе 10 Гр на установке «Хизотрон» (Co^{60} , 1,25 МэВ). Мощность радиационного воздействия составляла 0,86 Гр/мин. Облучение в дозе 10 Гр вызывало у крыс кишечную форму лучевой болезни – начало кривой Раевского. Крыс третьей экспериментальной группы помещали в специальные камеры, представляющие собой полуоткрытые системы, в головной отсек которых подавалась гипоксическая газовая смесь (8% O_2 и 92% N_2). Время подачи газовой смеси 11 мин 38 с. Скорость продувки – 20 л/мин. Животные четвертой группы испытывали сочетанное воздействие ионизирующего облучения с гипоксической газовой смесью (ГГС), при этом γ -облучение крыс проводилось сразу после применения ГГС. Забой экспериментальных и контрольной групп крыс и взятие материала проводился в зимний период в одно и то же время суток.

Тощую кишку фиксировали в растворе Бэккера, стандартно обрабатывали и заливали в парафин. Для обзорных целей парафиновые срединные продольные срезы окрашивали гематоксилином-эозином. *Базальную мембрану* (БМ) эпителиальной выстилки слизистой оболочки тощей кишки выявляли ШИК-реакцией на гликопротеиды. Измерение толщины слизистой оболочки тощей кишки и базальной мембраны эпителиальной выстилки проводили с помощью окуляр-микрометра. При окраске основным коричневым по Шубичу М.Г. с докраской гематоксилином определяли *общее число тучных клеток* (ОЧТК) и соотношение их морфофункциональных типов [2]: *недегранулированные* (НДГ) – определяющие состояние покоя; *дегранулированные* (ДГ) и *вакуолизованные* (ВК) – активные, высвобождающие гепарин и гистамин соответственно. Гистохимические реакции проводили на криостатных срезах, применяя метод одновременного азосочетания с инкубацией в среде, содержащей α -нафтилфосфат (1-*Naphthyl phosphate disodium salt*) и прочный синий *PP* (*fast blue RR salt*) для выявления фермента *щелочная фосфатаза* (ЩФ). Ее определяли в щеточной каемке столбчатых энтероцитов ворсинок. Выявление ферментативной активности *кислой фосфатазы* (КФ) проводили с использованием фосфата нафтола АС-МХ. КФ распределялась в эпителии ворсинок и крипт супрануклеарной зоны.

Анализ светооптической плотности ферментов проводился с использованием программы *Image J*. Статистическую обработку результатов исследований проводилась на ПК *Pentium III-500*, с помощью пакетов программ *Excel 2007*, *SSPS Statgraphics for Windows XP Professional* с использованием параметрических методов. Для оценки модифицирующего эффекта фактора нерадиационной природы на проявления ионизирующей радиации использовали коэффициент синергизма, позволяющий математически оценить силу действия модификатора и его направленность в сторону усиления радиочувствительности или радиорезистентности морфологических структур.

Результаты и их обсуждение. Визуальный осмотр препаратов тощей кишки от экспериментальных крыс после однократного изолированного γ -облучения в дозе 10 Гр выявил общее истончение слизистой оболочки за счет снижения высоты ворсинок и глубины крипт в хронодинамике эксперимента. Наблюдалось частичное опустошение крипт, энтероциты эпителиальной выстилки системы «ворсинка-крипта» уплощенной формы, к концу третьих суток на верхушках ворсин были обнаружены высокие энтероциты с крупным ядром и вакуолизированной цитоплазмой. Обнаруженная морфологическая кар-

тина подтверждает данные о проявлении ранних эффектов γ -облучения, которые характерны именно для тканей с высокой скоростью обновления, как компенсаторно-защитной реакции, препятствующей полному нарушению функциональности слизистой оболочки органа. Морфологические изменения в слизистой оболочке тощей кишки после однократного изолированного применения гипоксической газовой смеси, проявлялись достоверным увеличением высоты ворсинок, тогда как глубина крипт оставалась неизменной в сравнении с контрольной группой. Визуально ворсины и крипты не деформированы, энтероциты ворсин призматической формы. Предшествующее γ -облучению воздействию гипоксической газовой смеси проявлялось истончением слизистой оболочки тощей кишки за счет снижения высоты ворсинок и глубины крипт, с появлением кубического эпителия.

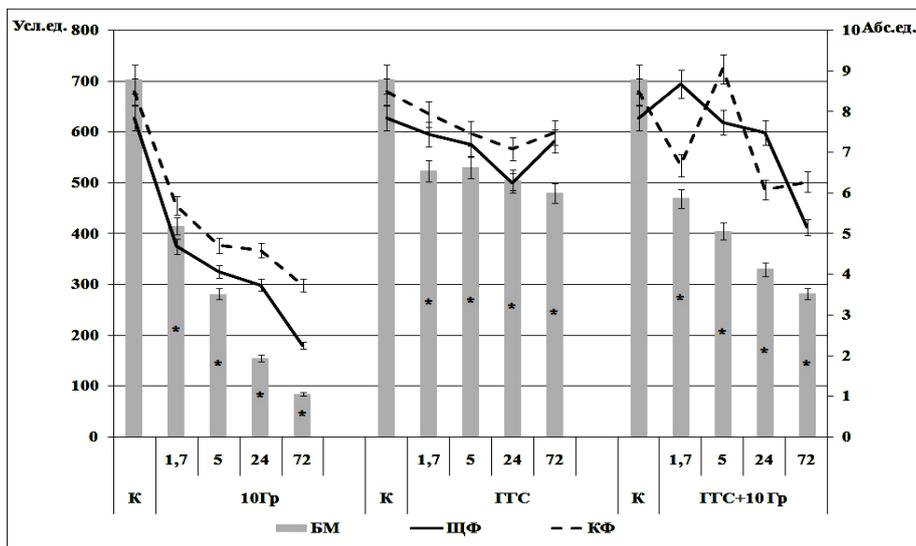


Рис. 1. Динамика гистоэнзиматических показателей слизистой оболочки тощей кишки в условиях эксперимента. Условные обозначения: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю

Анализ гистоэнзиматических критериев, отражающих интенсивность обменных процессов слизистой оболочки тощей кишки показал следующее. Облучение в дозе 10 Гр вызывало истончение базальной мембраны эпителия слизистой оболочки в хронодинамике наблюдения ($p < 0,05$). Наблюдалось достоверное снижение активности ЩФ без тенденции к восстановлению и с наибольшей выраженностью для исчерченной каемки эпителия спустя 1,7 часа, а в капиллярной сети стромы ворсинок и межкрип-тальной строме начиная с 5 часа после воздействия фактора. Активность КФ носила сходную направленность независимо от топографии ($p < 0,05$) (рис. 1). Изолированное воздействие гипоксической газовой смеси характеризовалось незначительным достоверным уменьшением толщины базальной мембраны эпителия слизистой оболочки в динамике сроков наблюдения. Светооптическая плотность ферментов в структурах слизистой оболочки тощей кишки мало отличалось от контроля (рис.1). Качественно была выявлена незначительная потеря светооптической плотности ЩФ в средней части ворсин и щеточной каемке энтероцитов. Светооптическая плотность КФ показывала равномерное распределение по всей поверхности ворсин. При сочетанном действии факторов толщина базальной мембраны эпителия была ниже в сравнении с контрольными показателями ($p < 0,05$). Активность ЩФ достоверно возрастала спустя 1,7 часа и затем снижалась к 72 часу с наибольшей интенсивностью в исчерченной каемке и строме ворсинок. Активность КФ повышалась спустя 5 часов с момента воздействия факторов, в дальнейшем испытывая тенденцию к снижению во временной динамике ($p < 0,05$) (рис. 1).

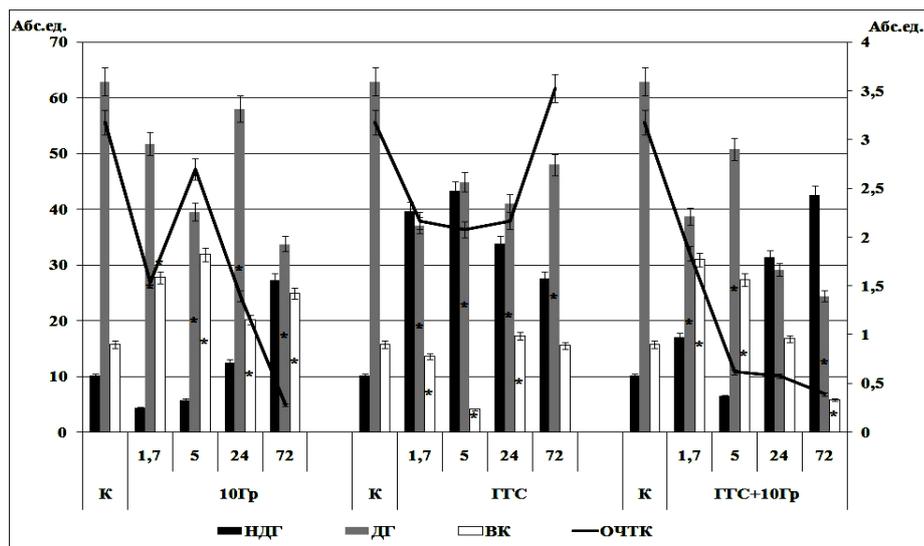


Рис. 2. Динамика тучных клеток соединительнотканной стромы слизистой оболочки тощей кишки в условиях эксперимента. Условные обозначения: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю

Рассмотрение динамики изменений общего числа тучных клеток и их функциональных типов представлено на рис. 2. Так, γ -облучение в дозе 10 Гр привело к снижению ОЧТК в соединительнотканной строме слизистой оболочки тощей кишки. Среди морфофункциональных типов тучных клеток наблюдалась тенденция к преобладанию неактивных форм с большей выраженностью на протяжении первых суток эксперимента. Среди активных форм выявлена достоверная смена дегрануляции на лизис по всем срокам наблюдения (рис. 2). Однократное изолированное применение гипоксической газовой смеси проявлялось достоверным снижением ОЧТК начиная с первых часов наблюдения и резким повышением к концу третьих суток ($p < 0,05$). Число ДГ тучных клеток достоверно снижалось в хронодинамике наблюдения, ВК формы проявляли разнонаправленную динамику, снижаясь через 1,7 и 5 часа ($p < 0,05$), возрастая через 24 часа ($p < 0,05$) и достигая значений контроля к концу третьих суток эксперимента. В условиях сочетанного действия факторов выявлено достоверное снижение общего числа тучных клеток. Число ДГ тучных клеток было достоверно снижено относительно показателей контроля на протяжении всего времени после воздействия факторов. ВК формы достоверно преобладали с 1,7 часа, достигая показателей контроля к 24 часу и достоверно снижались к последнему сроку наблюдения (рис. 2).

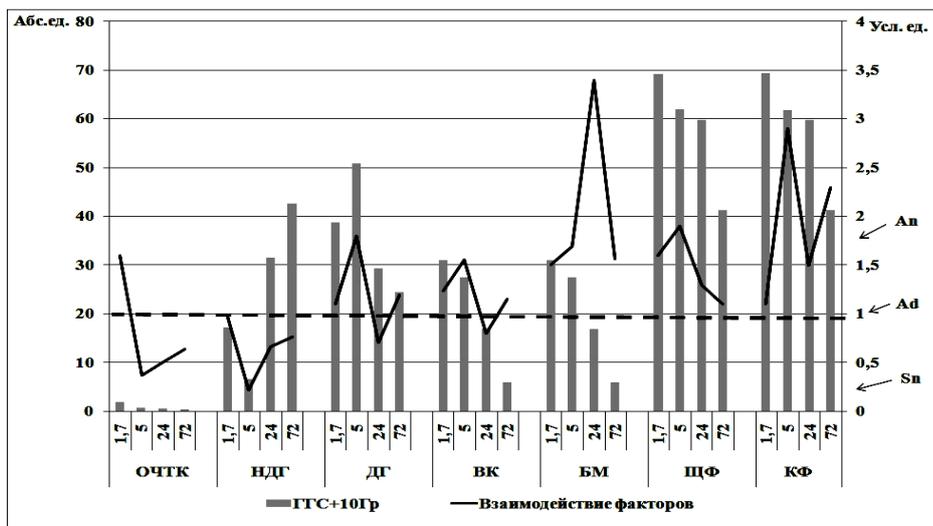


Рис. 3. Модель механизма взаимодействия факторов по морфофункциональным эквивалентам слизистой оболочки тощей кишки при сочетанном воздействии гипоксической газовой смеси и γ -излучения в дозе 10 Гр. Условные обозначения: An – антагонизм, Ad – аддитивизм, Sn – синергизм

Направленность взаимодействия факторов при сочетанном применении проявляла синергический характер по показателям ОЧТК на протяжении всего периода наблюдения, исключая время через 1,7 часа после воздействия, НДГ тучных клеток, приближаясь к эффекту однократного γ -облучения. По активным формам тучных клеток направленность действия факторов смещалась в сторону антагонизма, исключая показатели сформировавшиеся к концу первых суток эксперимента. Достоверный антагонистический эффект был выявлен для показателей толщины базальной мембраны и светооптической плотности щелочной и кислой фосфатаз в хронодинамике эксперимента (рис. 3). Преобладание антагонистического эффекта по реагированию морфологических эквивалентов функционального состояния слизистой оболочки тощей кишки дает возможность предположить повышение резистентности слизистой оболочки тощей кишки в условиях модификации гипоксической газовой смесью.

Заключение. Таким образом, предшествующее применение гипоксической газовой смеси носило радиопротективный характер и проявлялось восстановлением процессов пристеночного пищеварения и всасывания, по показателям щелочной и кислой фосфатаз и тенденцией к восстановлению гомеостатического равновесия на местном уровне за счет функциональной активности морфофункциональных типов тучных клеток и выделяемых ими биологически активных веществ.

Литература

1. Аклев А.В., Иванов В.К., Сазыкина Т.Г., Шинкарев С.М. Последствия ядерной аварии на АЭС «Фукусима-1» // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2015. Т. 60, № 5. С. 12–24.
2. Воронцова З.А., Черкасова Ю.Б., Золотарева С.Н. Морфолого-статистическая характеристика взаимодействия периферических эндокринных желез в экспериментальной модели отдаленных последствий γ -облучения // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-22. URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4797.pdf> (дата обращения 30.04.2014). DOI: 10.12737/3867.
3. Золотарева С.Н. Моделирование и прогнозирование морфофункционального состояния слизистой оболочки тощей кишки в условиях модификации эффектов ионизирующего облучения: дис. ...канд. биол. наук. Тула: ТулГУ, 2009. 178 с.
4. Логачева В.В. Анализ морфофункционального состояния щитовидной железы в прогнозировании радиомодифицирующего эффекта измененной газовой средой и электромагнитным излучением СВЧ-диапазона: дис. ...канд. биол. наук. Тула: ТулГУ, 2007. 215 с.
5. Матющенко Н.С., Закиров Дж.З., Кучук Э.М., Ибраева Н.И. Влияние радиационного воздействия на активность щелочной и кислой фосфатаз у предварительно адаптированных к высокогорью крыс // Материалы 9 международной научно-практической конференции, сборник: Научная индустрия европейского континента, Прага. 2013. Т. 28. С.53–54
6. Слюсарева О.А., Воронцова З.А., Зюзина В.В., Афанасьев Р.В. Эффективность малых доз γ -облучения в морфологостатистическом алгоритме экспериментальных исследований // Вестник новых медицинских технологий. 2011. Т.18, №2. С.166–169.
7. Черкасова Ю.Б. Модельное представление морфофункционального состояния системы периферических эндокринных желез в условиях отдаленности последствий γ -облучения: дис. ...канд. мед. наук. Тула: ТулГУ, 2009. 152 с.
8. Шишкина В.В., Воронцова З.А. Модифицирующие эффекты отдаленных последствий γ -облучения в диапазоне малых доз // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т.19, №2. С. 308–309.
9. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Анализ восстановления регенерации эпителия тощей кишки старых и зрелых лабораторных животных после воздействия ионизирующего излучения на фоне введения стволовых клеток // Таврический медико-биологический вестник. 2012. Т. 15, № 3. Ч. 1. С. 387–390.

References

1. Akleev AV, Ivanov VK, Sazykina TG, Shinkarev SM. Posledstviya yadernoy avarii na AES «Fukushima-1» [The consequences of the nuclear accident at the "Fukushima-1" NPP]. Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost'. 2015;60(5):12-24. Russian.
2. Vorontsova ZA, Cherkasova YB, Zolotareva SN. Morfologo-statisticheskaya kharakteristika vzaimodeystviya perifericheskikh endokrinnykh zhelez v eksperimental'noy modeli otdalennykh posledstviy γ -oblucheniya [Morphological and statistical characterization of the interaction of peripheral endocrine glands in the experimental model of the remote consequences of gamma-irradiation]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdanie. 2014 [cited 2014 Apr 30];1 [about 4 p.]. Russian. Available from: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4797.pdf>.

3. Zolotareva SN. Modelirovanie i prognozirovanie morfofunktsional'nogo sostoyaniya slizistoy obolochki toshchey kishki v usloviyakh modifikatsii effektivov ioniziruyushchego oblucheniya [Modelling and forecasting of morpho-functional state of the mucous membrane of the jejunum in a modification of the effects of ionizing radiation] [dissertation]. Tula (Tula region): TulGu; 2009. Russian.

4. Logacheva V.V. Analiz morfofunktsional'nogo sostoyaniya shchitovidnoy zhelezy v prognozirovanii radiomodifitsiruyushchego effekta izmenennoy gazovoy sredoy i elektromagnitnym izlucheniem SVCh-diapazona [Analysis of morpho-functional state of the thyroid gland in predicting radiomodifying effect of modified atmospheres and microwave electromagnetic radiation] [dissertation]. Tula (Tula region): TulGu; 2007. Russian.

5. Matyushchenko NS, Zakirov DZ, Kuchuk EM, Ibraeva NI. Vliyanie radiatsionnogo vozdeystviya na aktivnost' shchelochnoy i kisloy fosfataz u predvaritel'no adaptirovannykh k vysokogor'yu krysa [The impact of radiation exposure on the activity of alkaline and acid phosphatase in pre-adapted to the highlands of rats]. Materialy 9 mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, sbornik: Nauchnaya industriya evropeyskogo kontinenta, Praga. 2013. Russian.

6. Slyusareva OA, Vorontsova ZA, Zyuzina VV, Afanas'ev RV. Effektivnost' malykh doz γ -oblucheniya v morfologostatisticheskom algoritme eksperimental'nykh issledovaniy [The effectiveness of low doses of γ -irradiation morfologostatisticheskom algorithm experimental studies]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2011;18(2):166-9. Russian.

7. Cherkasova YB. Model'noe predstavlenie morfofunktsional'nogo sostoyaniya sistemy perifericheskikh endokrinnykh zhelez v usloviyakh otdalennosti posledstviy γ -oblucheniya [Model representation of morpho-functional state of peripheral endocrine system in a remote consequences of γ -irradiation] [dissertation]. Tula (Tula region): TulGu; 2009. Russian.

8. Shishkina VV, Vorontsova ZA. Modifitsiruyushchie efekty otdalennykh posledstviy γ -oblucheniya v diapazone malykh doz [Modifying effects of long-term effects of γ -irradiation in low doses]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2012;19(2):308-9. Russian.

9. Yastrebov AP, Grebnev DY, Maklakova IYu. Analiz vosstanovleniya regeneratsii epiteliya toshchey kishki starykh i zrelykh laboratornykh zhivotnykh posle vozdeystviya ioniziruyushchego izlucheniya na fone vvedeniya stvolovykh kletok [Analysis restore regeneration of the epithelium of the jejunum of old and mature laboratory animals following exposure to ionizing radiation on the background of stem cell]. Tavricheskiy mediko-biologicheskii vestnik. 2012;15(3):387-90. Russian.

Библиографическая ссылка:

Золотарева С.Н., Черкасова Ю.Б., Логачева В.В., Кособуцкая С.А. Биоэффекты гипоксической газовой смеси и γ -облучения в эксперименте // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2016. №4. Публикация 2-2. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2016-4/2-2.pdf> (дата обращения: 03.10.2016). DOI: 10.12737/21855.