

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ТКАНЕВОЕ ДЫХАНИЕ ТИМУСА

*УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
г. Гомель, Беларусь*

В работе дана характеристика тканевого дыхания тимуса интактных и облученных в дозе 1 Гр белых крыс. Установлена зависимость показателей тканевого дыхания на эндогенных и экзогенных субстратах от срока прошедшего после облучения. Показано, что в тканях тимуса контрольных животных и на 30 сутки после облучения доминирующую роль в системе митохондриального окисления играет второй комплекс дыхательной цепи, тогда как на 90 сутки заметно возрастает значение первого комплекса.

Ключевые слова: острое ионизирующее облучение, тканевое дыхание

Различные ткани и органы сильно отличаются по своей чувствительности к ионизирующему излучению, что обуславливает характерную картину развития пострадиационных процессов в организме.

Тимус – лимфо-эпителиальный орган, который характеризуется высокой радиочувствительностью, и его облучение приводит к нарушению дифференцировки и созревания иммунокомпетентных клеток, что является одной из причин развития иммунодефицитов и других пострадиационных нарушений в иммунной системе [1]. Процесс созревания тимоцитов во многом обусловлен тимическим микроокружением, в формировании которого принимают участие разнообразные клеточные элементы: эпителиоциты, макрофаги, дендритные клетки, фибробласты, и др. [2]. Вскоре после облучения, повреждаются клетки, определяющие эндокринную функцию вилочковой железы, вследствие чего нарушается формирование факторов микроокружения тимоцитов и секреция на должном уровне гормонов тимуса [3].

Лимфоциты тимуса, находящиеся на разных этапах дифференцировки, отличаются по своей радиочувствительности. Кортикальные тимоциты представлены группой наиболее радиочувствительных клеток, а медулярные – считаются относительно радиорезистентными, так как

их устойчивость к облучению выше, чем у периферических Т-клеток [4]. Этим обусловлена роль данной зоны в постлучевых восстановительных процессах, обеспечивающих компенсаторное усиление лимфоцитопоеза на 7-21 сутки после воздействия – в период максимального его подавления в корковом веществе [5].

Таким образом, патогенез иммунодефицитов, вызванных ионизирующим излучением, имеет сложный характер и связан с дисфункцией тимуса и других центральных органов иммунной системы, посредством индукции нарушений как в самих клетках иммунной системы, так и в клетках его эпителиального ретикулама.

Немаловажную роль в развитии постлучевых повреждений тканей играют структурно-функциональные нарушения митохондрий, относящихся к одним из наиболее радиочувствительных оргanelл клетки [6]. Окислительное фосфорилирование, протекающее в митохондриях, обеспечивает клетку энергией АТФ, абсолютно необходимой для выполнения всех клеточных функций. Наиболее адекватным методом изучения митохондриального окисления является полярографический метод, отличающийся высокой чувствительностью, позволяющий, в условиях, наиболее приближенных к физиологическим, вести быстрые кинетические на-

блюдения при моделировании функциональных нагрузок и использовании специфических ингибиторов [7]. Указанные преимущества весьма важны для оценки метаболического состояния тканей облученного организма [8].

Показано, что после облучения в митохондриях наблюдается увеличение продукции активных форм кислорода и азота [9], которое сопровождается структурными изменениями мембран митохондрий, активности ключевых ферментов электрон-транспортной дыхательной цепи, степени сопряжения окислительного фосфорилирования и т.д., что в конечном итоге отражается на функциональной активности тканей и органов [10]. В связи с этим, анализ взаимосвязи структурных и функциональных изменений клеток тимуса после облучения позволит более глубоко раскрыть основные закономерности развития процессов клеточной патологии при воздействии ионизирующих излучений.

Цель исследования

Оценить состояние тканевого дыхания тимуса белых крыс на 30, 60 и 90 суток после острого ионизирующего облучения в дозе 1 Гр.

Материалы и методы исследования

При проведении исследований соблюдались все требования Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (18.03.1986, пересмотр 02.12.2005, Страсбург) и Директивы 86/609/ЕЕС «Защита животных, используемых в научных целях» (в редакции от 05.05.2009, Страсбург).

В исследованиях использовались белые, беспородные крысы-самцы массой 200-230 г. Экспериментальные животные содержались на стандартном рационе. Рандомизированным отбором сформировано две группы животных: сравнения и опытная. В первую группу было включено 5, а во вторую 15 животных. Опытную группу животных подвергли однократному обще-

му γ -облучению на установке «ИГУР-1», источник ^{137}Cs в дозе 1 Гр, мощность дозы 0,92 Гр/мин.

Анализ состояния клеток тимуса проводился на 30, 60 и 90 сутки после облучения. Животные умерщвлялись путем декапитации. Тимус извлекался, отмывался от крови физиологическим раствором, переносился в раствор Хэнкса. Ткани тимуса щадяще измельчались. Все исследования проводились при температуре 0-2°C. В полученных тканевых препаратах изучались показатели тканевого дыхания на установке Record 4 (ИТЭБ РАН, Пущино, Россия) в ячейке объемом 2 мл с закрытым платиновым электродом Кларка при температуре 37°C в растворе Хэнкса.

Состояния энергетического обмена исследуемой ткани определялись по скорости потребления кислорода тканями тимуса на эндогенных субстратах ($V_{\text{энд}}$), а также используя субстраты дыхания: 10 мМ сукцината, ($V_{\text{сук}}$) и 10 мМ глутамата ($V_{\text{глу}}$). Кроме того, изучалась скорость потребления тканью тимуса кислорода в присутствии разобщителя окислительного фосфорилирования 0,1 мМ 2,4-динитрофенола ($V_{\text{днф}}$). Наряду с этим оценивались параметры митохондриального дыхания при ингибировании: первого комплекса дыхательной цепи – 2,5 мМ амитала натрия и второго комплекса – 10 мМ малоната натрия. Использование указанного перечня субстратов и ингибиторов дыхания позволяет достаточно полно охарактеризовать состояние энергетического обмена и, в известной мере, оценить скорость процессов, лимитирующих тканевое дыхание [8]. На основании данных ингибиторного анализа рассчитывались показатели АРД (амиталрезистентного дыхания) $\text{АРД} = V_{\text{ам}} / V_{\text{энд}}$; и МРД (малонатрезистентного дыхания) $\text{МРД} = V_{\text{мал}} / V_{\text{ам}}$.

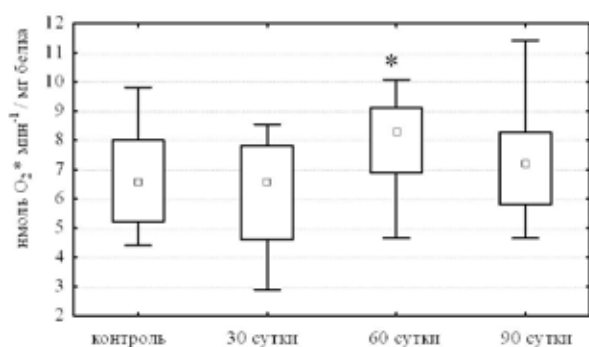
Приведенные показатели характеризуют эндогенные пулы субстратов, их соотношение, а также состояние мембранных транспортных систем, активность различных участков дыхательной цепи митохондрий и степень сопряжения окислительно-

го фосфорилирования [11, 12]. Скорость поглощения кислорода тканевыми препаратами выражалась в нмоль O_2 / (мин×мг белка) исследуемой ткани. Определение белка в тканях тимуса проводилось биуретовым методом [13].

Полученные данные проанализированы на соответствие закону нормального распределения. Данные представлены медианой и верхним и нижним квартилями. Сравнение средних разных выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Различия признавались значимыми при $p < 0,05$. Для анализа значимости зависимости параметров дыхания от сроков был использован тест ANOVA Краскела-Уоллиса. Статистический анализ данных осуществлялся с помощью пакета Statistica 6.0.

Результаты исследования

Уровень энергетического метаболизма является интегральным показателем, отражающим функциональную активность ткани, общее состояние большинства метаболических путей и процессов в клетке. Дыхание тимоцитов животных контрольной группы на эндогенных субстратах составило 6,6; 5,2-8,0 нмоль O_2 / (мин×мг белка) (рисунок 1). Достаточно высокий уровень дыхания, вероятно, обусловлен высокой функциональной, в том числе пролиферативной активностью тканей тимуса.



□ – медиана; □ – границы интерквартильного размаха; ⊥ – минимум и максимум; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни

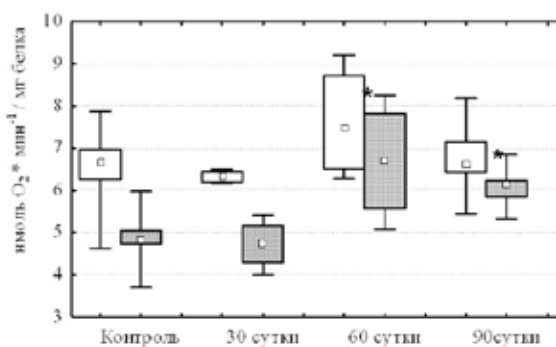
Рисунок 1 – Скорость тканевого дыхания тимоцитов крыс на эндогенных субстратах после облучения в дозе 1 Гр

Ранее мы показали, что в ближайшие сроки (3-10 сутки) после облучения в дозе 1 Гр наблюдается снижение скорости эндогенного дыхания более чем на 30% [14]. На 30 сутки после воздействия ионизирующего излучения происходит восстановление скорости эндогенного дыхания, которая достигает контрольных значений. При увеличении сроков наблюдения до 60 суток этот параметр значительно возрастает (до 8,3; 6,9-9,1 нмоль O_2 / (мин×мг белка), оставаясь выше контроля и на 90 сутки (рисунок 1).

Введение экзогенных субстратов дает возможность косвенно охарактеризовать их эндогенные пулы, активность ферментов первого и второго дыхательного комплекса клеток тимуса. Введение в систему экзогенных субстратов – глутамата и сукцината увеличивает интенсивность тканевого дыхания тимуса контрольных животных примерно на 20% (рисунок 2).

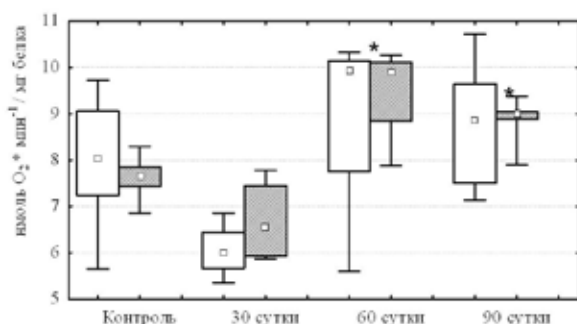
Необходимо отметить, что оба эти субстрата обладают примерно одинаковым стимулирующим действием. Если на 30 сутки после облучения они не оказывают, сколько нибудь существенного стимулирующего действия, то на 60 и 90 сутках их роль существенно возрастает.

Ингибиторный анализ выполнен с использованием амитала (ингибитора первого дыхательного комплекса) и малоната (ингибитора второго дыхательного комплекса) (рисунок 3).



□ – медиана; □ – границы интерквартильного размаха; ⊥ – минимум и максимум; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни

Рисунок 2 – Состояние тканевого дыхания тимоцитов крысы при добавлении субстратов в ближайшие сроки после облучения в дозе 1 Гр (□ – глутамат, ■ – сукцинат)



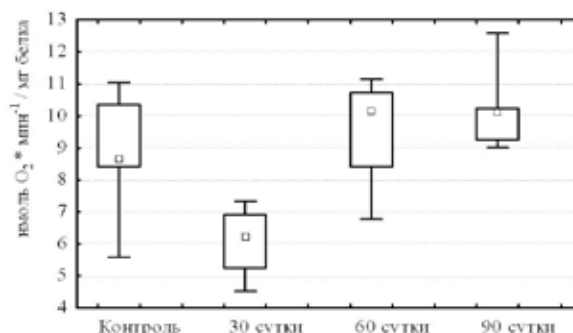
□ – медиана; □ – границы интерквартильного размаха; └ – минимум и максимум; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни

Рисунок 3 – Ингибиторный анализ состояния тканевого дыхания крысы в ближайшие сроки после облучения в дозе 1 Гр

(□) – амита́л натрия, (■) – малонат натрия).

Последовательное введение амита́ла и малоната вызывает ингибирование в начале первого, а затем второго комплекса дыхательной цепи, что позволяет оценить вклад каждого из них в общий механизм транспорта протонов в клетках тимуса, а также роль жирных кислот в тканевой энергетике. Более высокое значение коэффициента АРД по сравнению с таковым для МРД свидетельствует о высокой активности сукцинатдегидрогеназы и преобладающем вкладе второго комплекса дыхательной цепи в системе митохондриального окисления ткани тимуса крысы. В свою очередь коэффициент МРД – показатель «остаточного» дыхания, после добавления ингибиторов, указывает на вклад жирных кислот в энергетiku ткани. Если на 30 суток показатель АРД снижается, а МРД, напротив, возрастает (что свидетельствует об увеличении роли NADH-зависимого окисления), на 60 суток вклад первого и второго комплекса дыхательной цепи в энергетiku ткани уравнивается, то на 90-сутки коэффициент МРД превышает таковой для АРД. Последнее указывает на возрастание роли β -окисления жирных кислот в системе FAD-зависимого дыхания тканей тимуса облученного животного.

Скорость потребления кислорода после добавления разобщителя является максимально достижимой при данном состоя-



□ – медиана; □ – границы интерквартильного размаха; └ – минимум и максимум; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни

Рисунок 4 – Влияние динитрофенола на состояние тканевого дыхания тимоцитов крысы в ближайшие сроки после облучения в дозе 1 Гр

нии электронно-транспортной цепи и обеспеченности ее восстановленными эквивалентами. Разобщитель тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ)) рассеивает мембранный потенциал в митохондриях и таким способом максимально активируют электронно-транспортную систему, что позволяет определить ее предельную активность.

В тимусе контрольных животных при добавлении 2,4-ДНФ происходит возрастание показателей потребления кислорода более чем на 30% (рисунок 4).

К 30 суткам 2,4-ДНФ не оказывает дополнительного стимулирующего действия, указывая на то, что система тканевого дыхания работает на предельно возможном уровне и не имеет запаса «прочности». К 60 и 90 суткам после облучения на фоне более высокой, чем в контроле, дыхательной активности тканей тимуса, показатели стимулирующего действия 2,4-ДНФ возрастают, достигая контрольных значений.

Предварительная оценка показала, что распределение полученных показателей не подчиняется закону нормального распределения, в связи с чем для анализа зависимости параметров митохондриального дыхания тимуса от срока, прошедшего после острого облучения был использован непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа

Таблица – Анализ значимости зависимости параметров дыхания тимоцитов от срока после облучения

Показатель	n	H	Уровень p
V _{энд}	70	7,969	0,046
V _{глу}	18	6,284	0,099
V _{як}	18	12,68	0,005
V _{ам}	18	3,822	0,281
V _{мал}	18	9,928	0,019
V _{днф}	16	5,649	0,130

– тест ANOVA Краскела-Уоллиса, результаты которого представлены в таблице.

Проведенный анализ свидетельствует о наличии статистически значимой зависимости между сроками после облучения и скоростью эндогенного дыхания, величиной стимулирующего действия сукцината (субстрата второго дыхательного комплекса) и ингибирующего действия малоната натрия (ингибитора второго комплекса дыхательной цепи).

Выводы

1. Имеется статистически значимая зависимость скорости тканевого дыхания тимуса на эндогенных субстратах от срока (30, 60 и 90 сутки) прошедшего после острого облучения в дозе 1 Гр.

2. Несмотря на то, что уровень эндогенного дыхания тимуса на 30 сутки после воздействия острого облучения не отличается от контрольных значений, система его тканевого дыхания работает на предельно возможном уровне и не имеет запаса «прочности».

3. В тканях тимуса у контрольных животных и на 30 сутки после облучения доминирующую роль в системе митохондриального окисления играет второй комплекс дыхательной цепи, тогда как на 90 сутки заметно возрастает значение первого комплекса.

Библиографический список

1. Орадовская, И.В. Иммунологический мониторинг катастрофы в Чернобыле. Отдаленный период (2001-2006 гг.). Итоги

многолетних наблюдений / И.В. Орадовская. – Москва: Медицинская книга, 2007. – 607 с.

2. Торбек, В.Э. Ультраструктура эпителиоцитов тимуса потомства при изменении гормонального фона в функциональной системе мать-плод / В.Э. Торбек, Н.А. Юрина // Весн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. «Медицина». – 2000, № 2. – С. 45-49

3. Акоев, И.Г. Биофизика познает рак / И.Г. Акоев. – Москва: Наука, 1988. – 160 с.

4. Коляда Т.И. Некоторые особенности иммунного ответа под влиянием различных доз ионизирующего облучения у животных и человека / Т.И. Коляда [и др.] // Annals of Mechnicov Institute. – 2007. – № 3. – С. 17-22.

5. Кудряшов, Ю.Б. Основы радиационной биофизики / Ю.Б. Кудряшов Москва, Московский университет, 2004 – 350 с.

6. Rottenberg, H. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition / H. Rottenberg, S. Wu // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – Vol. 240, № 1. – P. 68-74.

7. Кондрашова, М.Н. Принципиальные преимущества полярографического изучения дыхания перед манометрическим / М.Н. Кондрашова // Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом: сб. ст. – Минск: Наука, 1973. – С. 80-93.

8. Грицук, А.И. Влияние инкорпорированных радионуклидов цезия на ультраструктуру и процессы тканевого дыхания митохондрий кардиомиоцитов / А.И. Грицук // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед.-біялагіч. навук. – 2002. – № 2. – С. 63-70.

9. Kevin Leach, J. Ionizing Radiation-induced, Mitochondria-dependent Generation of Reactive Oxygen/Nitrogen / J. Kevin Leach // CANCER RESEARCH. – 2001. – Vol. 61. – P. 3894-3901.

10. Грицук, Н.А. Влияние инкорпорации ¹³⁷Cs на показатели митохондриального окисления миокарда и динамику эхокардиографических параметров у крыс / Н.А. Грицук, А.И. Грицук, Е.Ф. Конопля // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2007. – № 2. – С. 105-111.

11. Иванов, А.А. Роль системы иммунитета в радиационном поражении организма. Развитие гипотезы. / А.А.Иванов // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2001. – Т.46, №3. – С 64-78.

12. Ерофеева, Л.М. Сравнительная характеристика морфологических изменений в тимусе после облучения гамма-лучами и ускоренными ионами углерода / Л.М. Ерофеева // Морфология. – 2008. – Т.133, №2. – С. 45.

13. Кочетков, Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетков. – Москва, 1980. – 220 с.

14. Никитина, И.А. Характеристика митохондриального дыхания тимуса интактных крыс и его изменение после воздействия ионизирующего облучения / И. А. Никитина, А. И. Грицук // Экологическая антропология: материалы XVI Международной научно-практической конференции «Экология человека в постчернобыльский период», Минск, 3-5 декабря 2008 / Институт истории Национальной академии наук Беларуси; Глав. редактор Л.И. Тегако. – Минск: Белоруски комитет «Дети Чернобыля», – 2009. – С. 288-291.

I.A. Nikitina, A.I. Gritsuk

INFLUENCE OF ACCUTE IONIZING RADIATION ON THYMUS TISSUE RESPIRATION

Characteristic of thymus tissue respiration on intact white rats and after exposure on ionizing radiation in dose 1 Gy is done in this work. Dependences of tissue respiration parameters on endogenous and exogenous substrates upon term after exposure are established. It is shown substantial role of respiration complex II on control animals and after 30 day after exposure, but on 90 day contribution to respiration complex I increase.

Key words: *tissue respiration, ionizing repiration, thymus*

Поступила 27.03.10