

**НЕСТОХАСТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МАЛЫХ ДОЗ РАДИАЦИИ.
АНАЛИЗ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ПАТОЛОГИИ В ПОПУЛЯЦИИ
НЕФРОЦИТОВ КРЫСЫ**

¹ Учреждение РАМН научно-исследовательский институт экспериментальной медицины
Северо-Западного отделения РАМН, г. Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова
МЧС России, г. Санкт-Петербург, Россия

Проведены электронно-микроскопические и светооптические наблюдения за выходом поврежденных клеток в эпителии почечных канальцев белых беспородных крыс – самцов после облучения животных γ -квантами в дозах 0.25 и 1.5 Гр. Исследования проводились на протяжении 6 мес. Полученные данные анализировались с точки зрения представлений о феномене «нестохастические эффекты малых доз», обнаруженном ранее на различных одноклеточных организмах и при изучении пострadiационных субклеточных нарушений в эндотелии капилляров миокарда крысы. Показано, что уже при дозе 0.25 Гр происходит резкое (примерно на порядок) повышение спонтанного уровня гибели нефроцитов, которое сопровождалось увеличением выхода относительно легких, преимущественно очаговых ультраструктурных дефектов. Эффект не возрастал при 6-кратном увеличении дозы (до 1.5 Гр). Он был зарегистрирован в ранние сроки после воздействия (1/2 сут), охватывал практически всех животных, сохранялся на протяжении всего периода наблюдений, проявлялся вне связи с митозом. Эти характеристики не укладываются в общепринятые представления о стохастическом характере действия радиации. В то же время они вполне соответствуют фенотипу изучаемого нами необычного нестохастического повреждения.

Ключевые слова: нестохастические эффекты, ионизирующие излучения, малые дозы, эпителий почечных канальцев крысы, гибель клеток, ультраструктурная патология

Введение

Эпителий почечных канальцев относится к тканям с медленным обновлением клеточного состава (так называемые малообновляющиеся ткани). Внутриклеточное обновление в таких тканях преобладает над клеточным – путем митоза [1, 2]. Морфологическое повреждение в них ярко проявляется лишь при провокации регенерационного процесса [3]. Поэтому в физиологических условиях малообновляющиеся ткани (в том числе эпителий канальцев почки) считают радиорезистентными [4]. Обычно изучаемые генетические эффекты, которые проявляются только в ходе пролиферативных процессов, не могут обеспечить в них развития выраженной морфологической патологии. Это в особенности касается действия радиации в малых дозах,

когда, в соответствии с принципами стохастичности, вероятность возникновения традиционно изучаемых эффектов очень мала.

Данная ситуация находится в противоречии с тем, что малообновляющиеся ткани являются критическими в развитии отдаленных соматических (неканцерогенных) последствий действия радиации [4].

В связи с этим представляют интерес экспериментальные данные, которые позволяют по-новому подойти к оценке радиочувствительности малообновляющихся тканей и по-новому поставить вопрос об их участии в развитии отдаленной соматической патологии.

В многолетних исследованиях, проведенных на объектах разного уровня (от простейших до млекопитающих) продемонстрировано существование неиз-

вестных ранее нестохастических деструктивных клеточных эффектов, которые принципиально отличаются от традиционно изучаемых рядом необычных признаков: 1) массовым возникновением в популяциях уже при очень низких для объектов дозах; 2) наличием обширного плато на кривых «доза-эффект»; 3) отсутствием оздоровления популяций на протяжении долгих сроков. Наконец, указанные эффекты проявляются вне связи с пролиферативными процессами, что и может обеспечить им участие в развитии у млекопитающих лучевого поражения «критических» малообновляющихся тканей, в том числе при малых дозах радиации [5-10].

Повреждение такого типа широко исследовано в эндотелии кровеносных капилляров миокарда облученных крыс [6-8]. Показано, что оно состоит в устойчивом дозозависимом повышении выхода клеток, несущих разнообразные ультраструктурные нарушения, как очаговые, так и тотальные, в том числе не совместимые с жизнью клеток

В данном сообщении мы представляем анализ материалов, полученных на другой малообновляющейся ткани – эпителии почечных канальцев. Мы остановимся главным образом на результатах, касающихся жизнеспособности нефроцитов, так как устойчивое снижение этого показателя в тканях с низкой пролиферативной активностью может со временем приводить к серьезной патологии – развитию депопуляции той или иной степени [11]. В эндотелии капилляров миокарда эти последствия были выражены достаточно отчетливо [11].

Материал и методы исследования

Проведены электронно-микроскопические и светоптические наблюдения за клетками эпителия проксимального отдела почечных канальцев у интактных и облученных крыс. Полученные данные анализировали с точки зрения представлений об изучаемых необычных клеточных эффектах. Исследование выполнено на беспородных белых крысах – самцах с

исходной массой 180-200 г. Проводилось общее облучение животных γ -квантами на аппарате «ЦЕГО» с мощностью дозы 195 г/час при дозах 0,25 и 1,5 Гр. Контрольные крысы находились в тех же условиях, но не облучались. Животных декапитировали после предварительной наркотизации. Для электронно-микроскопического анализа кусочки коркового вещества почки фиксировали по Карновскому на фосфатном буфере (рН 7.4), дополнительно фиксировали в 1-процентном растворе четырехоксида осмия в том же буфере и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы после контрастирования урацил-ацетатом и цитратом свинца просматривали на микроскопе JEM-100B. Для светоптической микроскопии часть материала фиксировали в жидкости Буэна и заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Для основной задачи работы – количественного анализа содержания в клеточных популяциях гибнущих нефроцитов использовали методы светоптической микроскопии, позволяющие исследовать обширные гистологические срезы почки. Это давало возможность значительно увеличить выборку исследуемых клеток (до 12000) и учитывать неравномерность распределения изменений.

Исследования производили через 0,5, 1, 4, 5 и 6 месяцев после облучения. Каждый временной этап и вариант эксперимента представлен данными, полученными от 3-8 животных. Статистические расчеты выполнялись с использованием пакета программ Excel и Statistica 6.0.

Результаты исследования

Для понимания полученных нами нетривиальных результатов коротко остановимся на опубликованных ранее данных о действии радиации в малой и более высоких дозах на жизнеспособность клеток в эндотелии капилляров миокарда крысы [8]. Погибающими считали клетки с признаками генерализованной деструкции органоидов, с повреждением плазмолеммы и разрушением ядерных структур [11].

Рисунок 1 отражает встречаемость таких клеток в популяции эндотелиоцитов на протяжении многих месяцев в контроле (спонтанная гибель) и после общего рентгеновского облучения в дозах 0,5, 2,25 и 4,5 Гр. На рисунке видно, что уже при дозе 0,5 Гр имеется значительное, длительно сохраняющееся, повышение выхода нежизнеспособных эндотелиоцитов по сравнению с контролем, и что данный эффект заметно не возрастает даже при 9-кратном увеличении этой дозы. Видно также, что повреждение проявилось у большинства облученных животных.

Электронно-микроскопические исследования показали, что при дозах 0,5–4,5 Гр повышение вероятности гибели эндотелиоцитов сопровождается появлением значительного количества клеток с относительно легкими, преимущественно очаговыми ультраструктурными цитоплазматическими нарушениями. Хромосомных aberrаций при этих, а также и при значительно более высоких дозах (локальное облучение в дозах 9, 30, 48 и даже 100 Гр) не наблюдалось [11]. Эффект имел место на фоне свойственной эндотелию сосудов очень низкой митотической активности [11]. Это позволило утверждать, что описанные изменения происходят вне связи с митозом.

Ввиду того, что нежизнеспособные клетки неминуемо обречены на элиминацию, был сделан вывод о том, что на протяжении длительного периода исследований они систематически появляются *de novo*. Такая ситуация возможна лишь в том случае, если примененные воздействия индуцируют в популяции эндотелиоцитов некие массовые стабильные латентные (скрытые)

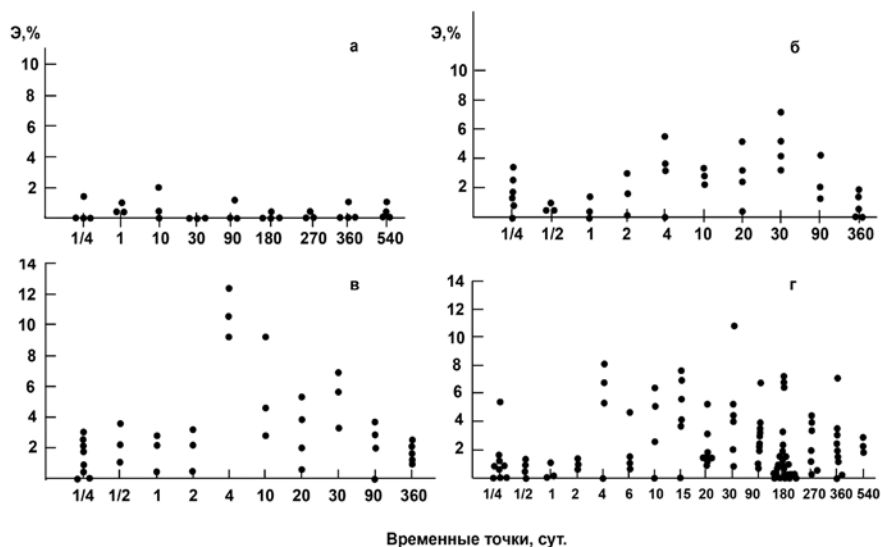


Рисунок 1 — Частота встречаемости нежизнеспособных эндотелиоцитов (Э, %) в капиллярах миокарда intactных крыс (а) и крыс, облученных в дозах 0,5 (б), 2,5 (в) и 4,5 (г) Гр. Каждая точка соответствует данным, полученным для одного животного

изменения, проявляющиеся в повышении предрасположенности клеток к повреждению и гибели.

Перейдем теперь к рассмотрению материала, полученного в наблюдениях за выходом нежизнеспособных клеток в эпителии почечных канальцев intactных и облученных крыс. В эту категорию входили нефроциты с грубым тотальным повреждением цитоструктур: с признаками выраженного некроза, сопровождающегося глыбчатым разрушением органоидов, появлением большого количества вакуолей (вакуольный тип дегенерации) и разрушением ядра, а также клетки с терминальными апоптозоподобными изменениями. Погибающие клетки подвергались десквамации и элиминировались [12, 13]. Нежизнеспособные клетки в эпителии почечных канальцев, так же как и в эндотелии, наблюдались на фоне многочисленных относительно легких, преимущественно очаговых цитоплазматических нарушений. Гибнущие нефроциты и в контроле, и в опыте встречались значительно реже, чем в сосудистой эндотелии, что связано, скорее всего, с относительно меньшей функциональной нагрузкой на эту ткань. Тем не менее были обнаружены

те же общие закономерности повреждения, что и в эндотелии кровеносных сосудов.

На рисунке 2 представлены данные о процентном содержании нежизнеспособных нефроцитов в эпителии почечных канальцев у контрольных животных. При этом, как и для эндотелия, приведены результаты, полученные для отдельных крыс в разные временные периоды наблюдений. Видно, что в контроле нежизнеспособные клетки либо вообще не регистрируются, либо встречаются исключительно редко. Возрастных изменений, как это имело место и в эндотелии капилляров миокарда, не наблюдается.

Рассмотрим результаты, полученные после облучения животных γ -квантами (рисунок 3). Видно, что уже столь слабое воздействие как облучение в дозе 0,25 Гр резко (примерно на порядок) повышает выход нежизнеспособных нефроцитов. При этом эффект не ослабевает на протяжении весьма длительного периода наблюдений (до 6 мес). Очень похожая картина, как в отношении степени изменений, так и их временной динамики, имеется и при значительно более высокой дозе – 1,5 Гр.

Средние значения содержания нежизнеспособных клеток с их квадратичными погрешностями в контроле и при обеих дозах, рассчитанные на каждой из временных точек, даны на рисунке 4. Рисунок убеждает в резкой выраженности пострадиационного эффекта, его независимости от величины дозы радиации и отсутствии достоверной временной динамики.

Выход погибающих нефроцитов, а тем более клеток, несущих относительно легкие ультраструктурные изменения, был значительно выше частоты их деления (митотический индекс в опыте не превышал 1,5 %). Это свидетельствует об отсутствии и в данном случае заметной зависимости эффекта от клеточного деления.

Обнаружение нежизнеспособных (дегенерирующих) клеток на протяжении многомесячных наблюдений показывает, что такие клетки (как и в сосудистом эндо-

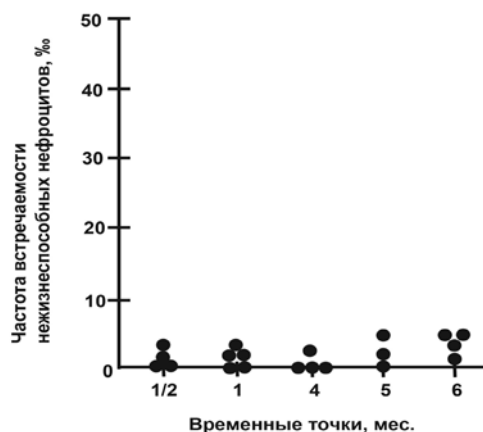


Рисунок 2 – Частота встречаемости нежизнеспособных нефроцитов в почечных канальцах интактных крыс. Каждая точка соответствует данным, полученным для одного животного

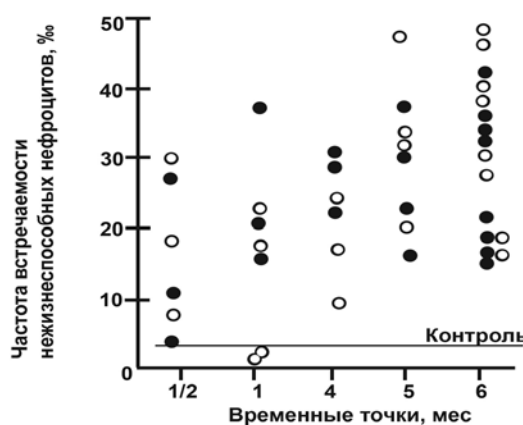


Рисунок 3 – Частота встречаемости нежизнеспособных нефроцитов в почечных канальцах у крыс, через разные сроки после облучения в дозах 0,25 и 1,5 Гр. Каждая точка соответствует данным, полученным для одного животного

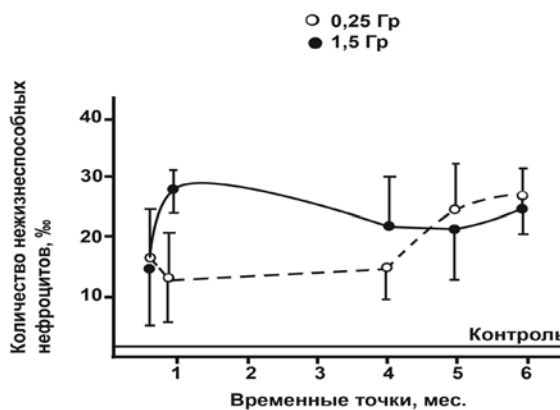


Рисунок 4 – Средние значения содержания нежизнеспособных нефроцитов с квадратичными погрешностями на разных сроках после воздействия

телии) систематически появляются *de novo*. Это позволяет считать, что и в популяции нефроцитов в основе эффекта лежит возникновение неких массовых, устойчивых, дозозависимых латентных изменений.

Итак, эпителий канальцев почки, который, как и другие малообновляющиеся ткани, относят к категории радиорезистентных, оказался высокочувствительным по признаку изучаемых нами необычных изменений. Эффект регистрировали уже при наименьшей использованной дозе – 0,25 Гр. При этом закономерности пострадиационного повреждения нефроцитов были принципиально сходными с таковыми, обнаруженными ранее при наблюдениях за эндотелиальными клетками кровеносных сосудов. В обоих случаях уже при малых дозах радиации отмечалось значительное повышение спонтанного уровня гибели клеток, которое сопровождалось выраженным повышением выхода разнообразной относительно легкой ультраструктурной патологии. Эффект сохранялся на протяжении длительного времени. Он имел насыщение по дозе, что позволяет отнести его к категории нестохастических. Изменения регистрировали у подавляющего большинства животных. Частота гибели клеток не была связана с интенсивностью их деления. Имеются основания полагать, что в обоих случаях повреждение обусловлено массовыми долгоживущими латентными изменениями, степень которых не возрастает с ростом дозы.

Выявлены и определенные особенности в реакции сравниваемых тканей: разный характер некротических процессов (прежде всего преобладание у нефроцитов вакуольного типа дегенерации), а также разная интенсивность гибели клеток. Частота гибели нефроцитов на единицу времени, как это видно на рисунках, была и в контроле и в опыте на порядок ниже, чем соответствующие величины для эндотелиоцитов. В соответствии с этим в эпителии канальцев почки после облучения развивалась значительно меньшая депопуляция, чем в эндотелии ка-

пилляров миокарда. В эндотелии она ярко проявлялась морфологически в виде появления участков с истончением эндотелиальной выстилки [11]. В случае же почки этот процесс удавалось зарегистрировать только по косвенному признаку – компенсаторному увеличению размеров нефроцитов [12, 13]. Это представляет интерес для понимания медико-практического значения изучаемых эффектов.

Что же касается общей характеристики реакции, то указанные различия не являются принципиальными. Они не противоречат выводу об однотипности наблюдаемых изменений.

В теоретическом отношении важно, что описанная нами необычная форма реакции зарегистрирована не только в исследованных тканях млекопитающих, но и у биологических объектов самой разной организации: различные представители типа простейших, отдаленные друг от друга в филогенетическом отношении амёбы, разные виды инфузورий [5, 9, 14], беспозвоночные животные – дафнии [10]. Судя по всему, это явление широко распространено в природе.

Конкретные молекулярно-генетические механизмы феномена остаются неизвестными. Признаки этого феномена (прежде всего массовость изменений уже при малых дозах радиации и нестохастический характер) не позволяют связать его с мутациями. В общей форме он может быть, по видимому, отнесен к категории эпигеномных изменений, внимание к которым со временем делается все более и более пристальным [15-19].

Библиографический список

1. Сидорова, В.Ф. Возраст и восстановительная способность организмов у млекопитающих / В.Ф.Сидорова. – М.: Медицина, 1976. – 200 с.
2. Саркисов, Д.Н. Обновление структур организма / Д.Н., Саркисов, Л.М. Аруин // Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. – М.: Медицина, 1987. – С. 20-35.

3. Стрелин, Г.С. Регенерационные процессы в развитии и ликвидации лучевого повреждения / Г.С. Стрелин. – М.: Медицина, 1978. – 208 с.
4. Ярмоненко, С.П. Радиобиология человека и животных / С.П. Ярмоненко. – М.: Высшая школа, 1977, – 368 с.
5. Бычковская, И.Б. Проблемы отдаленной радиационной гибели клеток / И.Б. Бычковская – М.: Энергоатомиздат, 1986. – 158 с.
6. Бычковская, И.Б. Детермини-рованные последствия действия изучения в малых дозах. Особые долгоживущие клеточные эффекты в эндотелии кровеносных сосудов / И.Б. Бычковская, Р.П. Степанов, // Мед. радиол. и радиац. безопасность. – 2000. – Т.45, № 1. – С. 26-35.
7. Бычковская, И.Б. Особые долговременные изменения клеток воздействию радиации в малых дозах / И.Б. Бычковская, Р.П. Степанов, Р.Ф. Федорцева // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 1. – С. 20-35.
8. Особые клеточные эффекты и соматические последствия облучения в малых дозах / И.Б. Бычковская [и др.]. – СПб: СПИКС, 2006. – 150 с.
9. Сарапульцева, Е.И. Нестохастическое снижение способности организма после слабых лучевых воздействий. Модельные опыты на *Daphnia magna*. / Е.И. Сарапульцева, Р.Ф. Федорцева, И.Б. Бычковская // Мед. радиология и радиационная безопасность. – 2008. – № 5. – С. 3-7.
10. Сарапульцева, Е.И. Изменение жизнеспособности *Daphnia magna* после γ -облучения в диапазоне относительности малых доз / Е.И. Сарапульцева, Ю.Ю. Малина // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 1, С. 82-84.
11. Воробьев, Е.И. Ионизирующая радиация и кровеносные сосуды / Е.И. Воробьев, Р.П. Степанов – М.: Энергоатомиздат, 1985. – 124 с.
12. Степанов, Р.П. Анализ эффектов повреждения, индуцированных в тканях почки воздействием относительно малых доз ионизирующих излучений / Р.П. Степанов, О.В. Кирик, В.Н. Комаревцев // Актуальные вопросы военно-полевой терапии: матер. Всеармейской научно-практической конференции «Медицинские последствия экстремальных воздействий на организм». – СПб, 2000. – С. 296-297.
13. Кирик, О.В. Структурные изменения в эпителии канальцев почки крыс: автореф. дис. ... канд. наук. – СПб., 2004. – 16 с.
14. Бычковская, И.Б. О жизнеспособности потомков облученных клеток (опыты *Amoeba proteus* *Paramecium caudatum*) / И.Б. Бычковская, Г.К. Очинская // Радиобиологии. – 1973. – Т. 13, вып. 2. – С. 211-213.
15. Nanney, D.L. Experimental ciliatology: an introduction to genetic and developmental analysis in ciliates / D.L. Nanney. – New York, 1980. – 333 p.
16. Голубовский, М.Д. Концепция эпигенов 20 лет спустя / М.Д. Голубовский // Биополимеры и клетка. – 1996. – Т. 12, № 6. – С. 5-24.
17. Riggs, A.D. Overview of epigenetic mechanisms / A.D. Riggs, T.N. Porter // Epigenetic mechanisms of gene regulation / Eds. V. E.A. Russo, R.A. Martien and A.D. Riggs // New York Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1996. – P. 29-45.
18. Jablonka, E. The inheritance of acquired epigenetic variation. / E. Jablonka, M.J. Lamb // J. Theor. Biol. – 1989. – Vol. 139. – P. 69-83.
19. Jablonka, E. The epigenome in evolution: beyond the modern synthesis / E. Jablonka, M.J. Lamb // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12, № 1/2. – С. 242-254.