

ПРОДУКЦИЯ ВТОРИЧНЫХ РАДИКАЛОВ В ВЕНОЗНОЙ КРОВИ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ «IN VITRO» МАЛЫМИ ДОЗАМИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Федотова А.С.

Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

Макарская Г.В.

Институт вычислительного моделирования СО РАН. Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

Тарских С.В.

Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

В статье, представлены данные исследования влияния малых доз ионизирующего излучения на кинетику генерации вторичных радикалов в образцах венозной крови КРС при облучении «in vitro». С помощью хемилюминесцентного метода установлено, что кинетика образования вторичных радикалов клетками крови крупного рогатого скота имеет два пика. Увеличение поглощенной дозы сопровождается ускорением процесса спонтанного и активированного образования вторичных радикалов клетками венозной крови. Наиболее выражен эффект активации антиоксидантной системы в образцах крови под воздействием дозы 3 мГр. При активации фагоцитарного процесса частицами латекса в образцах крови достоверное увеличение суммарной продукции АФК в крови сохраняется при всех поглощенных дозах.

Ключевые слова: радикалы, люминол, хемилюминесценция, ионизирующее излучение, малые дозы, венозная кровь, крупный рогатый скот, индекс активации.

PRODUCTION OF SECONDARY RADICALS IN VENOUS BLOOD AT IRRADIATION «IN VITRO» WITH LOW DOSES OF IONIZING RADIATION

Fedotova A.S.

Krasnoyarsk state agrarian university, Krasnoyarsk, Russia

Makarskaya G.V.

Institute of Computational Modeling SB RAS. Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS», Krasnoyarsk, Russia

Tarskikh S.V.

Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS», Krasnoyarsk, Russia

The article presents data on the assessment of the effect of low doses of ionizing radiation on the kinetics of the generation of secondary radicals in samples of venous cattle blood during "in vitro" irradiation. Using the chemiluminescent method, it was found that the kinetics of the formation of secondary radicals by the blood cells of cattle has two peaks. The increase in the absorbed dose is accompanied by the acceleration of the process of spontaneous and activated formation of secondary radicals by venous blood cells. The most pronounced effect of activation of the antioxidant system in the blood sample of cattle under the influence of a dose of 3 mGy. Upon activation of the phagocytic process by latex particles in blood samples, a significant increase in the total production of ROS in the blood is maintained at all absorbed doses.

Key words: radicals, luminol, chemiluminescence, ionizing radiation, small doses, venous blood, cattle, activation index.

До настоящего времени исследователи не пришли к единому мнению о последствиях воздействия малых доз ионизирующего излучения на организм животных. Согласно докладу научного комитета по атомной энергии при ООН к малым дозам ионизирующего излучения относят дозы менее 250 мГр. Результаты одних исследователей свидетельствуют, что ионизирующее излучение в низких дозах незаметно, но крайне губительно, действует на органы и системы организма, без проявления клинических признаков. При действии низких доз ионизирующего излучения на организм, эффект обратно пропорционален дозе, согласно этой гипотезе, в области малых доз на единицу дозы риск выше, чем при воздействии значительных доз [4]. Другая часть ученых – приверженцы гипотезы об отсутствии, воздействия низких доз на ткани, органы и системы организма [7]. В 1980 году Т. Д. Лак-

ки вводит термин радиационный гормезис – это благоприятное воздействие малых доз облучения на организм. Механизм радиационного гормезиса объясняется иницированием синтеза белка, активации гена, репарации ДНК в ответ на действие ионизирующего излучения в малой дозе (уровень естественного радиоактивного фона территории Земли). Эта реакция вызывает активацию мембранных рецепторов, пролиферацию клеток крови и стимуляцию иммунной системы. В связи с существованием такого количества мнений по оценке влияния малых доз радиации на биологический объект, данный вопрос является актуальным предметом исследований [5].

Наиболее чувствительными к воздействию даже слабых доз ионизирующего излучения в любом организме являются процессы генерации активных форм кислорода (АФК) клетками и их органеллами [1, 6]. Изменение свободнорадикальных процессов приводит к повреждению молекулярных структур клеток (ДНК, РНК, мембранных липидов и белков и т.д.), активации антиоксидантной системы, стимуляции иммунной системы. Высокочувствительные хемилюминесцентные методы оценки процесса генерации АФК в периферической крови и клеточных суспензиях иммунокомпетентных органов адекватно отражают состояние свободнорадикальных процессов [2], это позволяет выявить их незначительные изменения при различных физиологических состояниях. В настоящее время хемилюминесцентные методы широко используются для мониторинга антиоксидантных и прооксидантных свойств биологических систем [2, 8]. Существуют работы по оценке степени воздействия малых доз облучения на кинетику генерации свободных форм кислорода в периферической крови овец [9,10]. Однако работ по оценке изменений хемилюминесцентной кинетики генерации АФК клетками периферической крови при действии низких доз ионизирующего излучения при облучении «in vitro» в настоящее время ограниченное количество, которое не позволяет всесторонне провести оценку особенностей данного процесса.

Целью работы: определение степени влияния малых доз ионизирующего излучения на кинетику генерации вторичных радикалов в венозной крови крупного рогатого скота при облучении «in vitro». В задачу работы входило: отбор проб венозной крови, облучение проб крови в дозах 3,0 мГр, 6,0 мГр и 50 мГр с последующим определением уровня и интенсивности продукции вторичных АФК.

Исследования проводились в 2019 – 2020 г. всего исследовано 48 проб крови крупного рогатого скота. Облучение проб крови проводили на установке «УПО-Интер», укомплектованной источником Cs-137. Оценку кинетики генерации вторичных радикалов выполняли хемилюминесцентным методом, в качестве ХЛ-зонда использовали люминол (ОН⁻, Н₂О₂, НСЮ⁻ и др.).

Определяли показатели кинетики ХЛ – реакции: время достижения максимума (Т_{max}, мин); светосумма (S, имп. за 180 мин); индекс активации (ИА = S_{акт}/S_{спонт.}, усл. ед.). Хемилюминесцентный анализ проведен по методу В.М. Земскова с соавторами [3]. Хемилюминесцентный анализ выполнялся на 36-канальном аппаратно-программном комплексе «Хемилюминометр 3601 – ПЭВМ» (СКТБ «Наука» СО РАН). Время записи хемилюминесцентной кривой – 180 мин, температура в регистрационной камере +38°С. Статистическая обработка цифрового материала проведена методом вариационной статистики с помощью прикладных программ Microsoft Office Excel 2007. Различия параметров ХЛ считали достоверными при P ≤ 0.05.

Кинетика образования вторичных люминол усиленных радикалов клетками крови крупного рогатого скота характеризовалась двумя максимумами (рис.1).

Время формирования пиков генерации вторичных радикалов имело следующие особенности, при воздействии дозы 3мГр время достижения первого максимума спонтанной продукции вторичных радикалов регистрировалось на 21 мин., второго – на 140 мин, при активации частицами латекса первый максимум регистрировался на 48 мин, второй – на 136 мин. При дозе облучения 6мГр время достижения первого максимума спонтанной продукции вторичных радикалов приходилось на 21 мин., второго – на 147 мин, при активации частицами латекса первый максимум приходился на 19 мин, второй – на 102 мин. При дозе облучения 50 мГр время достижения первого максимума спонтанной генерации вторичных радикалов регистрировалось на 15 мин., второго – на 139 мин, при активации частицами латекса время первого максимума составляло 19 минут, второй пик приходился на 113 мин. С увеличением поглощенной дозы происходит сокращение времени достижения первого максимума спонтанного и активированного образования вторичных радикалов клетками периферической крови. При этом только при поглощенной дозе в 3,0 мГр отмечалось достоверное (P<0,05) снижение в сравнении с контролем амплитуды первого максимума генерации вторичных АФК антигенактивированными клетками крови, Л

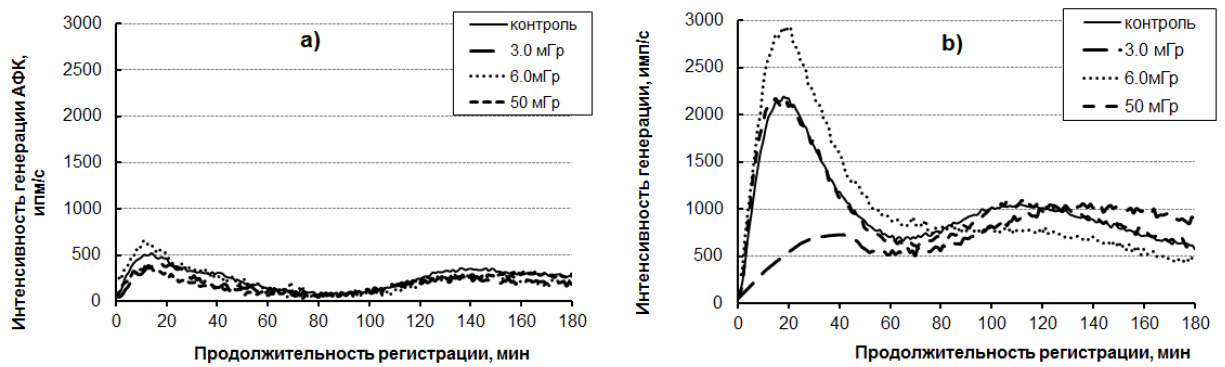


Рисунок 1 – Хемилюминесцентная кинетика генерации вторичных люминол усиленных АФК при спонтанной (а) и антигенактивированной (б) активности клеток крови при облучения в малых дозах.

Суммарное количество вторичных АФК, генерирующихся спонтанно в крови при дозах 3,0мГр, 6,0 мГр и 50 мГр, статистически не отличаются (рис.2). При активации фагоцитарного процесса частицами латекса в образцах крови достоверное ($P<0,01$) увеличение суммарной продукция АФК в крови имело место при всех поглощенных дозах, достоверно не отличающееся от контрольных.

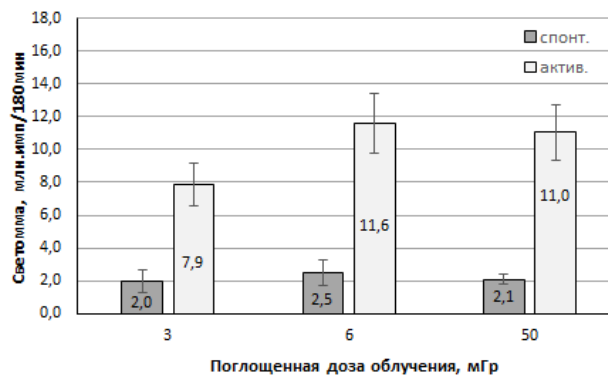


Рисунок 2 – Светосумма люминол усиленной хемилюминесценции при спонтанной и антигенактивированной продукции АФК клетками крови

Индекс активации (ИА), рассчитанный на основании полученных данных и отражающий способность клеток крови (нейтрофилов, моноцитов) к генерации АФК в ответ на антигенную стимуляцию, представлен на (рис.3).

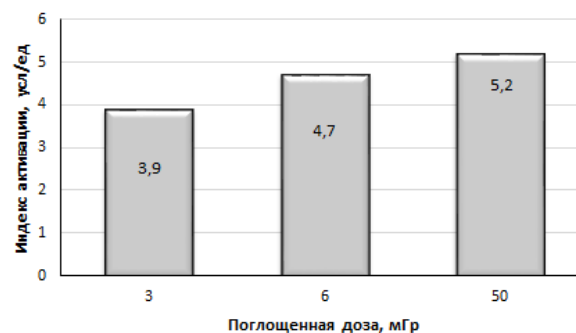


Рисунок 3 – Значение индекса активации генерации АФК клетками крови при действии малых доз облучения

Значение Индекса активации образования вторичных радикалов при поглощенных дозах 3,0 мГр, 6,0мГр и 50мГр находится в одном диапазоне изменчивости и статистически не отличается. Это указывает на одинаковые резервные возможности нейтрофилов к генерации АФК.

Кинетика образования вторичных радикалов клетками крови крупного рогатого скота имела два пика как в контрольных, так и в подвергнутых облучению образцах. Увеличение поглощенной дозы сопровождалось ускорением процесса спонтанного и антиген активированного образования

вторичных радикалов клетками периферической крови. Наиболее выражен эффект активации антиоксидантной системы в крови КРС под воздействием поглощенной дозы в 3 мГр. При активации фагоцитарного процесса частицами латекса в образцах крови достоверно увеличивается суммарная продукция АФК в крови при всех поглощенных дозах. Индекс активации образования вторичных радикалов при поглощенных дозах 3,0 мГр, 6,0 и 50 мГр находится в одном диапазоне изменчивости и статистически не отличается.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-44-240004 р_а

Литература

1. Алесина М.Ю. Формирование радиобиологических эффектов при хроническом внутреннем и внешнем облучении экспериментальных животных в малых дозах. / М.Ю. Алесина // Международный журнал радиационной медицины №2. Киев. 1999. С.92–99.
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи биологической химии. Т. 49, Москва. 2009с. 341–388.
3. Zemskov V.M., Barsukov A.A., Gnatenko D.A. Fundamental and applied aspects of analysis of the oxygen metabolisms of phagocytic cells / V.M. Zemskov, A.A. Barsukov, D.A. Gnatenko, N.S. Shishkina, A.N. Kulikova, M.N. Kozlova // Biology Bulletin Reviews. 2014. I.2. PP.101-111.
4. Иванов А.А., Дорожкина О.В., Ворожцова С.В. и др. Ранний ответ клеток костного мозга мышей на кратковременное облучение в широком диапазоне доз. / А.А. Иванов, О.В. Дорожкина, С.В. Ворожцова, А.Н. Абросимов, Т.М. Булынина., В.Н. Гаевский, И.Б. Ушаков, Е.А. Красавин // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 56, Москва. 2016. С. 389–396.
5. Михайлов В.Ф., Засухина Г.Д. Новый подход к стимуляции защитных систем организма малыми дозами радиации / В.Ф. Михайлов, Г.Д. Засухина // Успехи современной биологии. Т.140, № 3. Москва 2020.
6. Протас А. Ф. Активность антиоксидантных ферментов и уровень свободнорадикальных процессов в ядрах клеток нейронов при низких дозах облучения / А. Ф. Протас // Биополимеры и клетка. Т. 12. No 3 Киев. 1996С. 47-53.
7. Рождественский Л.М. Концепция биологического действия ионизирующей радиации низкого уровня (анализ, проблемы в аспектах пороговости эффектов и радиочувствительности биоструктур различного уровня организации) / Л.М. Рождественский // Радиационная биология. Радиоэкология Т. 39. No 1. Москва 1999С. 127–144.
8. Созарукова М.М., Полимова А.М., Проскурнина Е.В. и др. Изменения в кинетике хемилюминесценции плазмы как мера системного окислительного стресса / М.М. Созарукова, А.М. Полимова, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // Биофизика Т.61, № 2. Москва 2016. С.337-344.
9. Fedotova A S, Makarskaya G V, Tarskikh S V. An impact of low doses radiation on the kinetics of reactive oxygen species generation in sheep peripheral blood / A.S. Fedotova, G.V. Makarskaya, S.V Tarskikh, E.G. Turitsyna, V.A. Kolesnikov // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2019412 052016.
10. Федотова А.С. Особенности функциональной активности клеток крови овец в зонах с различной плотностью загрязнения ¹³⁷Cs. / А.С. Федотова // Вестник Красноярского ГАУ Вып.4. – Красноярск, 2019. С 88 – 97.
11. Kataoka T. Study of antioxidative effects and anti-inflammatory effects in vice due to low-dose X-irradiation or radon inhalation. Journal of Radiation Research V.54, 2013. PP.587–596.