

The influence of melaxen on the function of thrombocytes in the experimental hypo- and hyperaggregation

E.N. Lazareva, Kh.M. Galimzyaynov, M.A. Samotrueva

The work presents the data which were obtained in the experimental study of the regulatory action of the synthetic analog of melatonin – melaxen – on the functioning of the thrombocytes under conditions of hypo- and hyperaggregation. Hypoaggregation`s model of the thrombocytes dysfunction induced by introduction of acetylsalicylic acid (per os in dose of 20 mg/kg). Hyperaggregation was caused by the intraperitoneal injection of 0.1 ml of a 10% solution of calcium chloride. We studied the activity of melaxen in doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg. In our experimental work was found that melaxen in dose 1 mg/kg has correcting capability, reducing dysfunction of the thrombocytes which formed in experimental hypo- and hyperaggregation.

Key words: melaxen, thrombocytes, disruption of homeostasis, acetylsalicylic acid, calcium chloride.

Особенности организменного ответа мышей разных линий на острое гамма-облучение

Ю.С. Медведева¹, Е.Н. Архипова¹, И.Б. Алчинова¹, М.А. Озерова²,
А.С. Бобе¹, Ц.Ц. Содбоев², А.А. Антипов², М.Ю. Карганов¹

¹ – ФГБУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва

² – ФГОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва

Контактная информация: д.б.н., проф. Карганов Михаил Юрьевич, mkarganov@mail.ru

Действие ионизирующего излучения приводит к истощению пула стволовых клеток, увеличивает нагрузку на дифференцированные клетки, в результате усиливаются процессы репарации и апоптоза. Наряду с хорошо документированными острыми эффектами, радиотерапия приводит и к отсроченным, проявляющимся спустя годы после успешного лечения. Целью нашей работы было формирование и апробация комплекса тестов для определения последствий облучения с учетом различной радиочувствительности организма. Наблюдали общий сдвиг вклада в светорассеяния в сторону более мелких частиц у линий 101/Hf и СЗН/Sp, тогда как у мышей линии С57BL отмечали увеличение доли частиц большого диаметра. Гистологическое исследование показало, что в печени мышей линии С57BL, в отличие от других линий, отмечается уменьшение частоты встречаемости тяжелых повреждений к окончанию эксперимента. Такая же тенденция у этой линии обнаружена в ткани поджелудочной железы, а противоположная – в ткани селезенки. Таким образом, мышцы линии С57BL реагируют на облучение намного позже, чем линии 101/Hf и СЗН/Sp, при этом их адаптивность достаточно высока. Животные линии СЗН/Sp лучше всех выходят из радиационного кризиса.

Ключевые слова: облучение, межлинейные различия, лазерная корреляционная спектроскопия.

Современный уровень развития технологий заставляет все чаще рассматривать индивидуальные особенности реакций организма на воздействие экстремальных факторов. Ответом на любое экстремальное воздействие является активация общих систем адаптации, однако скорость их развития, степень экспрессии,

а главное, степень истощения и развитие компенсаторных реакций могут различаться. Именно от этих факторов в конечном счете зависит жизнеспособность организмов. Определение индивидуальных адаптивных особенностей человека затруднено ввиду значительного генотипического разнообразия и проводится, в основном, на физиологическом уровне с использованием нагрузочных тестов. Поэтому целесообразно совместно с ними проводить тесты, которые могут адекватно отразить изменения, происходящие на клеточном и биохимических уровнях, которые, в свою очередь, создают основу не столько для проявлений на уровне физиологии, сколько модифицируют предел изменений адаптационных и компенсаторных реакций.

Целью настоящего исследования было изучение межлинейных различий адаптивных возможностей организма мышей при воздействии экстремального фактора среды.

Материалы и методы

В исследовании использовали три линии мышей — 101/Hf, C3H/Sn и C57BL из коллекционного фонда Научного центра биомедицинских технологий ФМБА.

Несмотря на то, что процессы, вызываемые в организме лабораторных животных, некорректно напрямую переносить на человека, изменения, возникающие при действии факторов различной природы, позволяют определить направление поиска.

При сравнении различных линий мышей под воздействием облучения описано, что наиболее чувствительной к летальному действию облучения была линия BALB/cJ, а наиболее резистентной — 129/J. Линия 101/Hf в экспериментах с химическими мутагенами оказалась

наиболее чувствительной к мутагенному действию алкилирующих агентов, что, видимо, обусловлено дефектом системы эксцизионной репарации [5].

Облучение опытной группы мышей (C3H/Sn, n=9; 101/Hf, n=6; C57BL, n=12) проводили на цезиевом облучателе «Панорама» до общей дозы 750 рентген (Московская ветеринарная академия им. К.И. Скрябина). Контрольные группы (C3H/Sn, n=7; 101/Hf, n=10; C57BL, n=12) не подвергались облучению.

Измерение массы животных проводили на весах марки Mettler Toledo, за 1 ч до взвешивания животных лишали корма.

Забор крови у мышей проводили из малой подкожной вены голени через 3 дня, а также через 3 и 6 недель после облучения [10]. Субфракционный состав сыворотки крови мышей изучали с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии. Данный метод позволяет определить соотношение частиц разного размера в различных биологических жидкостях (сыворотке крови, моче и т.д.). Для многокомпонентных образцов результатом обработки является кривая с несколькими выраженными пиками. Сравнение площадей под кривой позволяет определить изменение процентного вклада в светорассеяние частиц разного размера [3, 12, 13]. Для характеристики смещения размеров частиц было принято целесообразным разделить всю область размеров на несколько интервалов. Для гистограмм сыворотки крови мышей можно выделить три основных интервала: 1 — от 0 до 20,58 нм; 2 — от 20,58 до 91,26 нм; 3 — свыше 91,26 нм.

Определение изменения количественных показателей клеток крови происходило путем подсчета лейкоцитарной формулы, которую проводили при иммерсионной микроскопии окрашенных

мазков. Использовалась комбинированная окраска по Паппенгейму [11].

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов (соотношение Т- и В-лимфоцитов) крови у мышей разных линий проводилось методом проточной лазерной цитометрии с использованием моноклональных антител с тройной меткой. В основе метода лежит взаимодействие моноклональных антител, меченных флюоресцентной меткой, с поверхностными антигенами лимфоцитов, и последующий анализ образцов на проточном лазерном цитометре. Однако применение одного типа моноклональных антител, меченных флюорохромом (т.н. «одинарная метка»), не всегда даёт объективную информацию о той или иной популяции лимфоцитов, поскольку каждая клетка несет на своей поверхности одновременно несколько типов антигенов. Более точное и информативное исследование субпопуляций достигается при использовании антител с большим количеством меток, т.е. к образцу крови добавляют одновременно 2, 3 и более моноклональных антител, несущих на себе различные флюоресцентные красители (зелёный — FITC (ФИТЦ) — флюоресцеин-5-изотиоцианат; жёлтый — PE (ФЭ) — фикоэритрин; красный — PE/Cy5 — тандем цианин 5-фикоэритрин).

Для анализа изменений в поведении грызунов после действия сильного стрессогенного фактора использовали установку «Открытое поле». В тесте оценивали вертикальную и горизонтальную двигательную активность. Длительность теста составляла 3 мин. Тестирование проводили в квадратной камере размером 45x45 см, при освещении в 40 Лк. В этом тесте оценивают поведенческие проявления, вызванные конфликтом мотивации страха и исследовательской активности.

При выполнении теста у мышей линии 101/Hf наблюдали попятные движения, описанные для неврологических мутантов hot-foot со структурно-функциональными аномалиями мозжечка [5].

В конце эксперимента все животные были подвергнуты эвтаназии путем передозировки анестезирующего препарата с дальнейшим взятием органов (печень, кишечник, поджелудочная железа, селезенка) для проведения гистологического исследования с целью оценки повреждающего действия облучения. Органы фиксировали в 4% растворе нейтрального формалина. Препараты готовили согласно принятой методике [4, 7].

Для упрощения обработки материала в зависимости от степени изменения морфологии клеток и тканей были выделены три степени тяжести повреждений [1].

Анализ полученных показателей проводили с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0», используя стандартные методы вариационной статистики.

Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г.

Результаты и их обсуждение

Ионизирующее излучение оказывает на живой организм неспецифическое действие. Организм не способен его ощутить, т.к. энергия ионизирующего излучения слишком мала, и, кроме того, не существует рецепторов, которые могли бы непосредственно ее воспринимать. В отличие от других видов воздействия, гамма-излучение проникает непосредственно и одновременно во все структурные элементы живой системы и влияет

на процессы жизнедеятельности. После облучения поддержание высокого уровня работоспособности клеток, тканей и органов осуществляется в большей степени за счет разрушения собственных жизненно важных структур и постепенного снижения общей устойчивости [2, 6].

Был исследован ряд параметров, каждый из которых может характеризовать ответ отдельной системы организма на облучение.

Одним из комплексных параметров, который объективно характеризовал состояние организма в целом, было изменение массы тела мышей. Из литературы известно, что острое облучение в высоких дозах приводит к стойкому снижению массы тела вследствие развития лучевой болезни [9]. В наших экспери-

ментах зарегистрировано снижение процента прироста массы после облучения в острой дозе. Однако есть данные о том, что облучение может приводить и к развитию метаболического синдрома после воздействия в высоких, но не летальных дозах [14]. Наблюдали снижение массы животных к 6-й неделе у трех линий в контроле и в опыте, исключая опытную группу линии C3H/Sn (рис. 1). У линии C3H/Sn наблюдали уменьшение прироста массы животных в опытной группе на 3-й неделе эксперимента, что, в общем, соответствует развитию острой фазы лучевой болезни. К 6-й неделе, в стадии восстановления, прирост возрастал. Суммарный прирост в контрольной и опытной группах за весь период эксперимента был приблизительно равным.

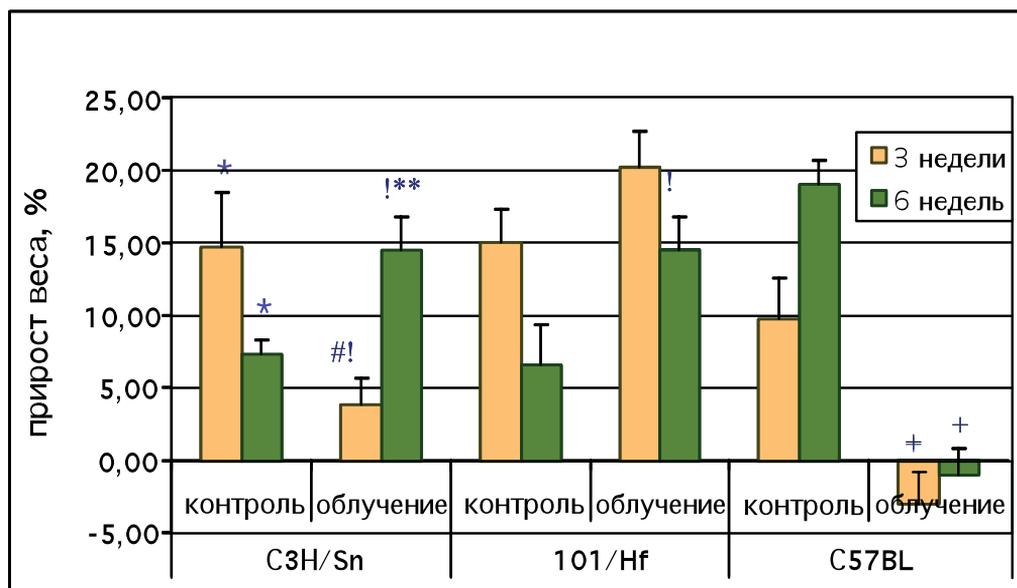


Рис. 1. Изменение прироста массы мышей разных линий, %.

! – $p < 0,05$ отличия опыта от контроля;

– $p < 0,001$ отличия линии C3H/Sn от линии 101/Hf;

+ – $p < 0,001$ отличия линии 101/Hf от линии C57BL;

* – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$ отличия линии C3H/Sn от линии C57BL (критерий Манна-Уитни).

У мышей линии 101/Hf к 3-й неделе прирост массы в опытной и контрольной группах был приблизительно равным. К 6-й неделе прирост массы в опыте был значительно выше, чем в контроле, что может свидетельствовать о развитии метаболического синдрома [14].

У мышей линии C57BL, как и у линии C3H/Sn, наблюдали снижение прироста массы к 3-й неделе, но без его восстановления к 6-й неделе, что свидетельствует о недостаточности восстановительных процессов после облучения.

Таким образом, судя по показателям массы, классический ответ на облучение развивается только у мышей линии C3H/Sn, т.к. у данных лабораторных животных присутствовала стадия восстановления.

с лабораторными животными, но, к сожалению, не позволяет адекватно определить механизмы происходящих сдвигов.

Изменения в картине крови являются основными признаками при воздействии гамма-излучения в значительных дозах.

Сравнение количества различных форменных элементов в крови мышей разных линий после облучения показало большие различия в содержании палочко- и сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов (рис. 2).

Основным критерием развития лучевой болезни является лимфопения. У мышей линии C57BL эффект облучения наблюдали уже через неделю после воздействия, и к 6-й неделе эксперимента количество лимфоцитов начинало по-

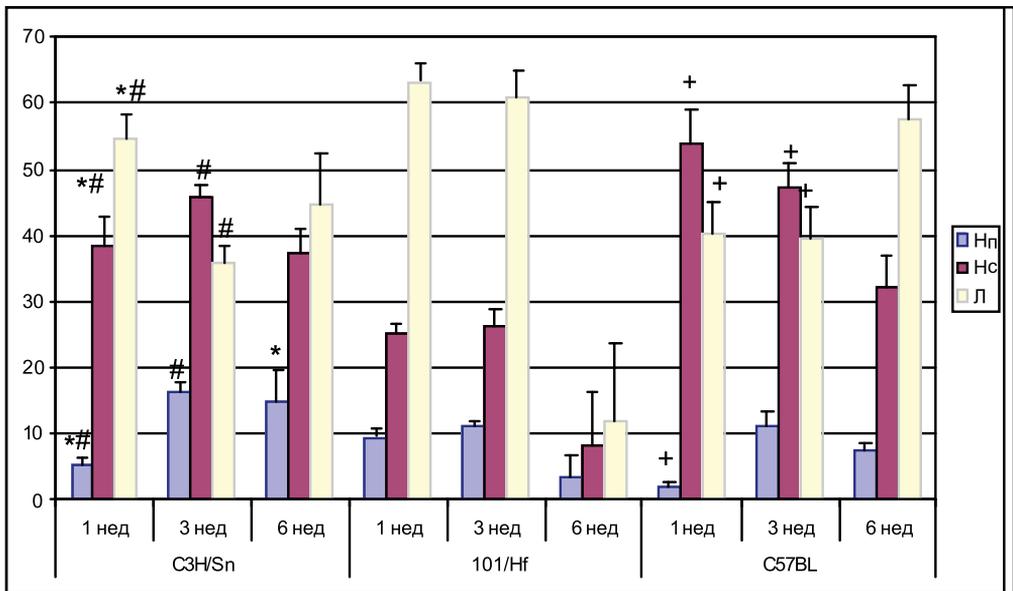


Рис. 2. Процентное содержание количества нейтрофилов и лимфоцитов в мазках крови мышей разных линий после облучения. По оси ординат – количество палочко-, сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в %.

– $p < 0,05$ отличия линии C3H/Sn от линии 101/Hf;

+ – $p < 0,05$ отличия линии 101/Hf от линии C57BL;

* – $p < 0,05$ отличия линии C3H/Sn от линии C57BL (критерий Манна-Уитни).

Процент прироста массы по группе может служить комплексным показателем скорости обменных процессов при работе

вышаться. У мышей линии 101/Hf наблюдали противоположную картину, и к 6-й неделе – выраженную лимфопению.

Мыши линии СЗН/Sp оказались самыми стабильными, незначительное понижение количества лимфоцитов, возникшее к 3-й неделе, восстанавливалось к 6-й неделе.

Определение субпопуляций лейкоцитов в течение эксперимента показало, что общая их численность практически не изменяется во времени у всех трех линий. Однако у линий СЗН/Sp и 101/Hf наблюдалось уменьшение как Т-, так и В-лимфоцитов к 6-й неделе, причем у ли-

римента после почти полного отсутствия Т- и В-лимфоцитов на 3-й неделе (рис. 3).

Действие ионизирующего излучения приводит к истощению пула стволовых клеток, увеличивает нагрузку на дифференцированные клетки, в результате усиливаются процессы репарации и апоптоза. Использование лазерной корреляционной спектроскопии позволяет определить общее направление изменений в сывороточном гомеостазе [12]. По срав-

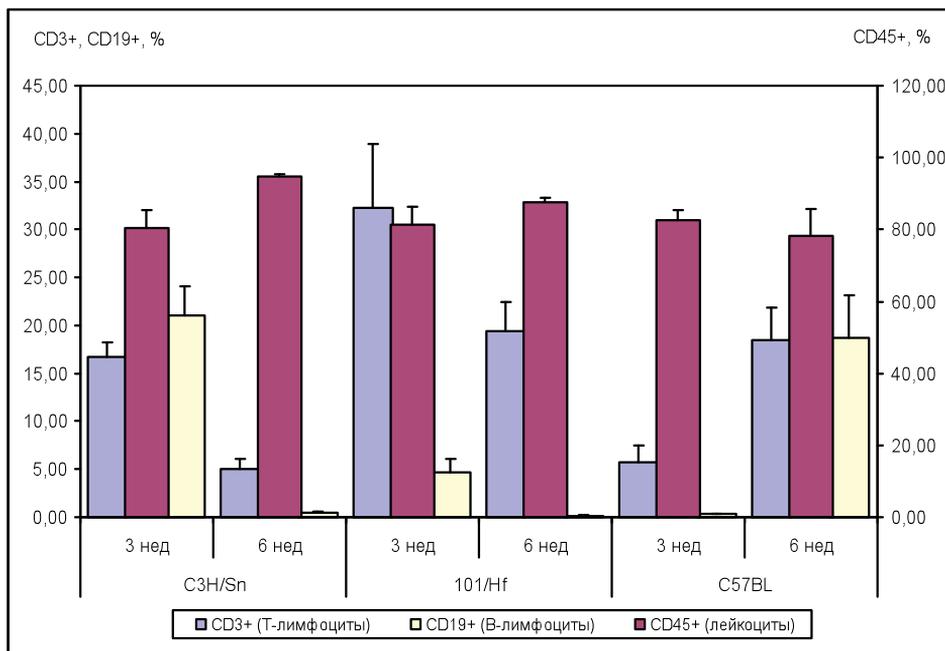


Рис. 3. Процент Т- и В-лимфоцитов у мышей разных линий после облучения.

– $p < 0,05$ отличия линии СЗН/Sp от линии 101/Hf;

+ – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$ отличия линии 101/Hf от линии С57BL;

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ отличия линии СЗН/Sp от линии С57BL (Критерий Манн-Уитни).

нии СЗН/Sp это было выражено ярче. У линии С57BL отмечали обратный сдвиг в сторону резкого увеличения лимфоцитов обеих популяций. Это свидетельствует об истощении пула Т-, В- и пре-В-лимфоцитов у мышей первых двух линий и восстановлении кроветворной функции у мышей линии С57BL к 6-й неделе экспе-

нению с контрольными значениями, у облученных животных линии 101/Hf наблюдали увеличение процентного вклада в светорассеяние частиц 3-й зоны на 3-й неделе и смещение 2-й зоны в сторону более крупных частиц. К 6-й неделе сохраняется значительный вклад частиц 3-й зоны (рис. 4).

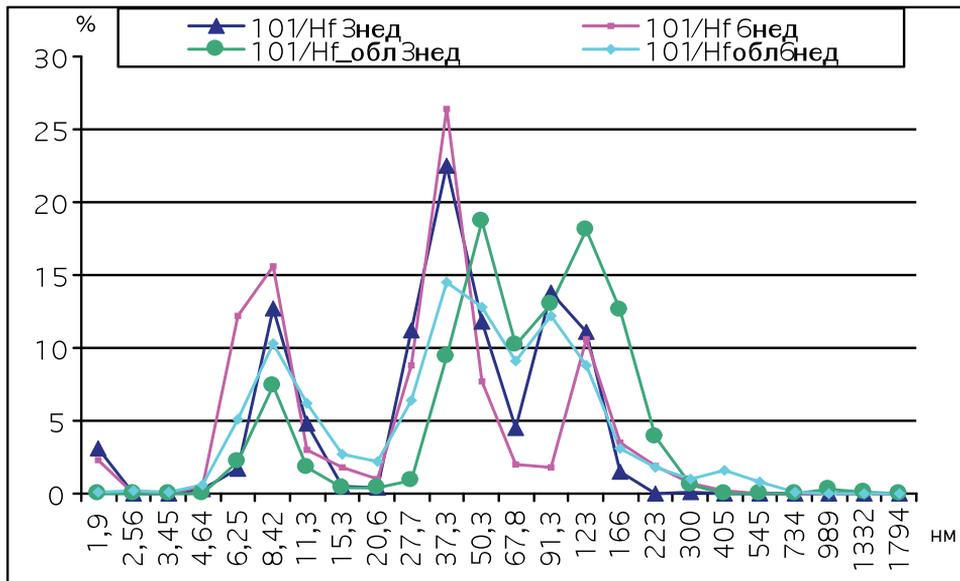


Рис. 4. ЛК-гистограмма сыворотки крови мышей линии 101/Hf на 3-й и 6-й неделях эксперимента. По оси абсцисс – размер частиц в нм, по оси ординат – процентный вклад в светорассеяние.

У мышей линии СЗН/Sp наблюдали значительное увеличение вклада в светорассеяние частиц 3-й зоны за счет уменьшения частиц 1-й зоны. Через 6 недель на-

блюдали появление более крупных частиц в сыворотке крови 2-й зоны по сравнению с контрольной сывороткой (рис. 5).

Для мышей линии С57BL характерно

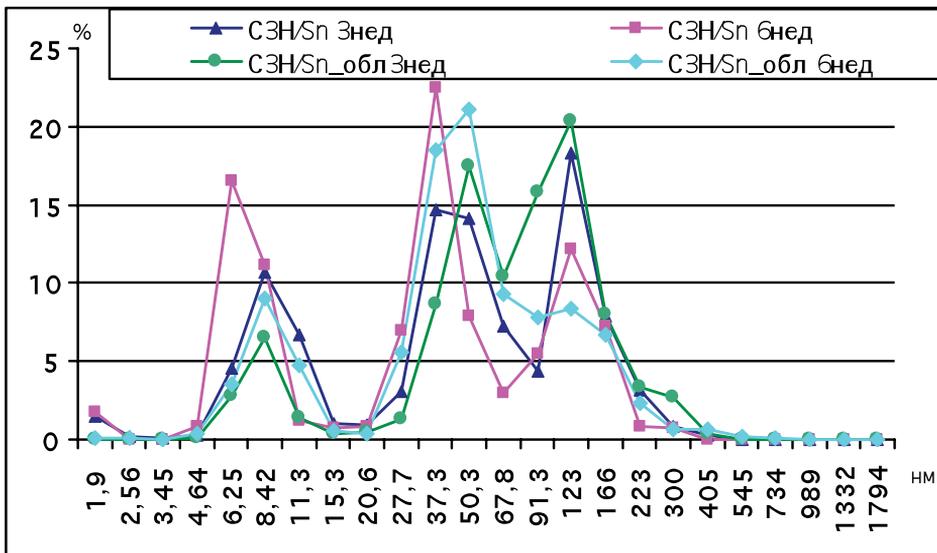


Рис. 5. ЛК-гистограмма сыворотки крови мышей линии СЗН/Sp на 3-й и 6-й неделях эксперимента. По оси абсцисс – размер частиц в нм, по оси ординат – процентный вклад в светорассеяние.

увеличение вклада частиц 2-й зоны через 3 недели эксперимента. К 6-й неделе происходило незначительное перераспределение в сторону более крупных частиц (рис. 6).

Возрастание процентного вклада ча-

Ионизирующее излучение влияет на функциональное состояние нервной системы и поведение в результате как прямого воздействия на нервную систему, так и косвенного, за счет реактивности

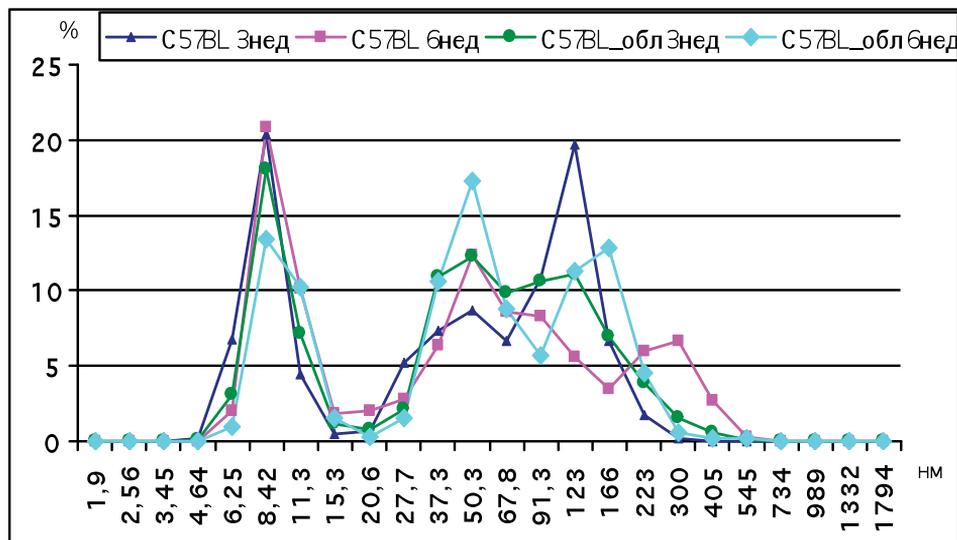


Рис. 6. ЛК-гистограмма сыворотки крови мышей линии C57BL на 3-й и 6-й неделях эксперимента. По оси абсцисс – размер частиц в нм, по оси ординат – процентный вклад в светорассеяние.

стиц крупного размера является показателем развития воспалительного процесса и увеличения количества продуктов деструкции клеток в сыворотке крови [13]. Изменение ЛК-гистограмм у мышей линии 101/Hf в сторону более крупных частиц было самым значительным и длительным. У линии C57BL этот процесс был менее выражен, а в сыворотке крови мышей линии C3H/Sn значительное увеличение на 3-й неделе процентного вклада в светорассеяние частиц 3-й зоны к 6-й неделе сходит на нет.

Положительная динамика в изменении клеточного состава крови у мышей линии C57BL в течение эксперимента согласуется с минимальными изменениями в процентном вкладе в светорассеяние частиц в сыворотке крови.

нервной системы на лучевое повреждение, вызываемое в других системах организма. При этом нервная реактивность может иметь большее интегративное физиологическое значение, чем прямое повреждение нервной системы в сверхлетальных дозах [8]. В тесте «Открытое поле» оценивают поведенческие проявления, вызванные конфликтом мотивации страха и исследовательской активности.

После воздействия радиоактивным излучением мыши линии C57BL снизили горизонтальную двигательную активность в течение 6-ти недель. У мышей линии 101/Hf и C3H/Sn двигательная активность до облучения и после отличалась только на 6-й неделе, где мы видим значительное снижение активности (рис. 7).

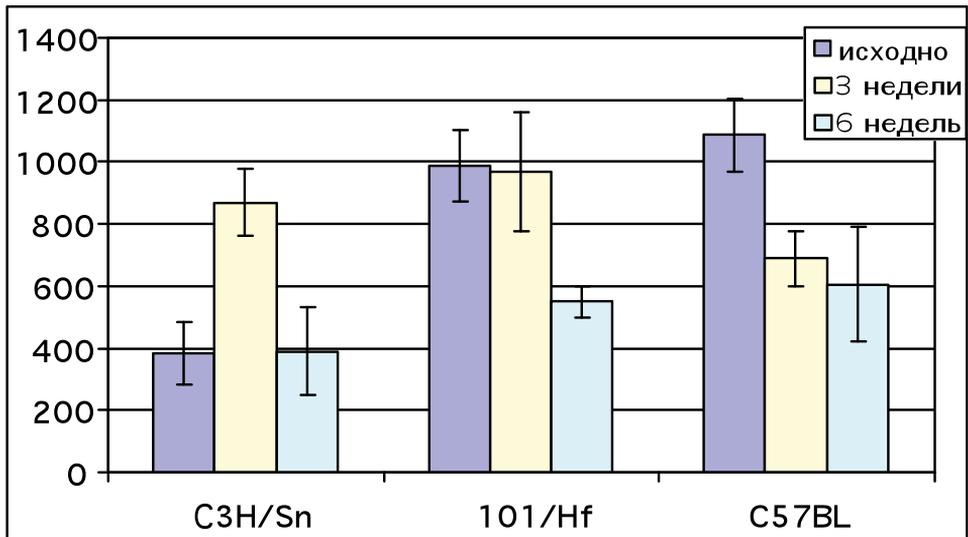


Рис. 7. Изменение горизонтальной двигательной активности у мышей разных линий после облучения, абс. значения.

Похожая картина наблюдалась при сравнении вертикальной двигательной активности мышей линий C3H/Sn и 101/Hf до и после облучения: к 6-й неделе вертикальная активность равна нулю. У мы-

шей линии C57BL произошло значимое уменьшение вертикальной активности на 1-й неделе и повышение двигательной активности в течение 3-й и 6-й недель (рис. 8).

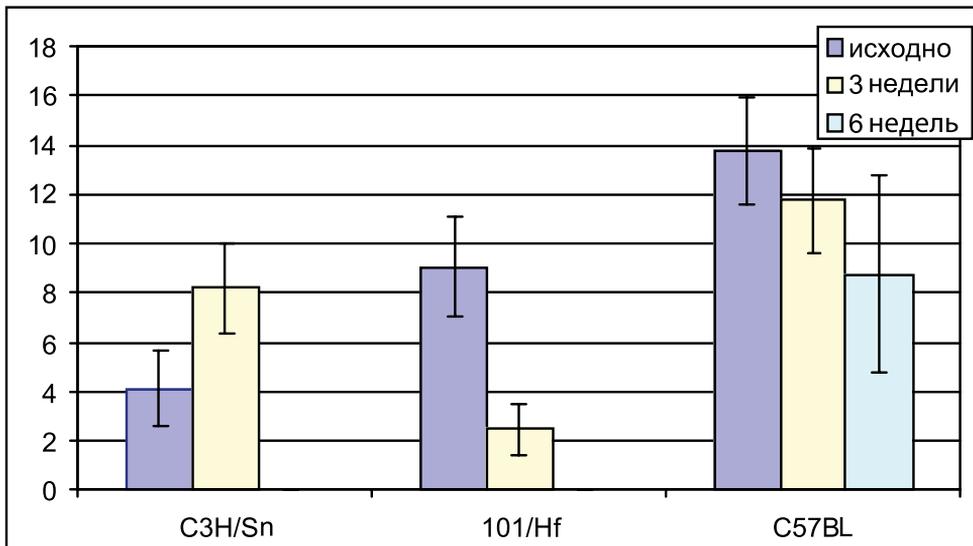


Рис. 8. Изменение вертикальной двигательной активности у мышей разных линий после облучения, абс. значения.

В изменении двигательной активности у животных разных линий можно отметить два типа ответа на воздействие гамма-излучения: срочный выраженный у мышей линии СЗН/Sn и отсроченный ответ, развивающийся только к 6-й неделе, у мышей линии С57BL.

Облучение в острой дозе 750 рентген вызывает деструкцию клеток как в процессе прямого воздействия облучения,

так и в результате образования активных форм кислорода.

У контрольных животных линий 101/Hf и СЗН/Sn, не подвергнутых облучению, ткани тонкого кишечника и печени не были поражены.

У облученных животных изменения тканей тонкого кишечника и печени были представлены в различных степенях тяжести (рис. 9А, Б).

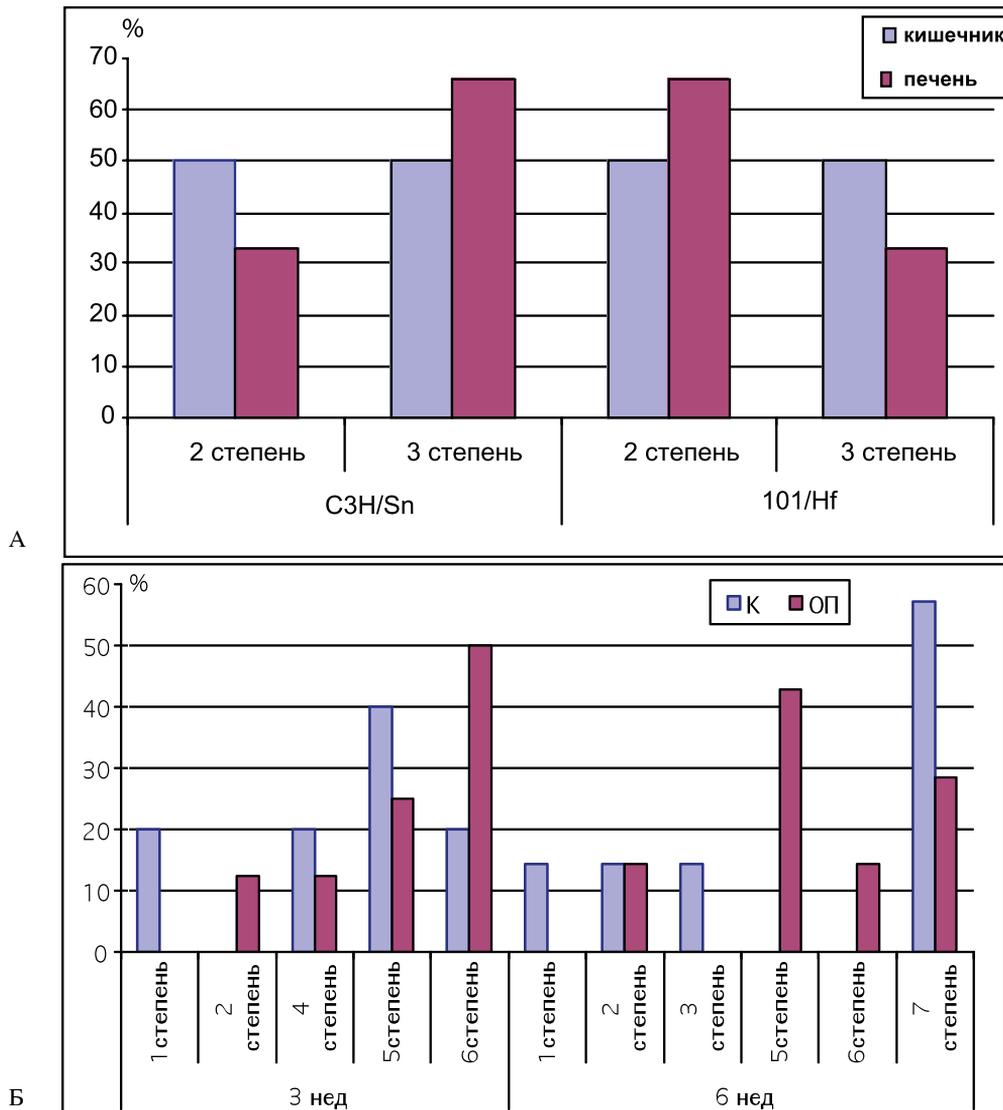


Рис. 9. Частота встречаемости повреждений в тканях тонкого кишечника и печени, %. А – повреждения тканей тонкого кишечника и печени у мышей линий СЗН/Sn и 101/Hf, Б – повреждения ткани печени у мышей линии С57BL.

Для того чтобы отследить динамику повреждения тканей для мышей линии C57BL, были дополнительно исследованы ткани селезенки и поджелудочной железы (рис. 10, 11). Как мы видим, уже

к 3-й неделе эксперимента наблюдался высокий процент животных с тяжелыми повреждениями тканей, и, хотя к 6-й неделе отмечалась положительная динамика, состояние их далеко от нормального.

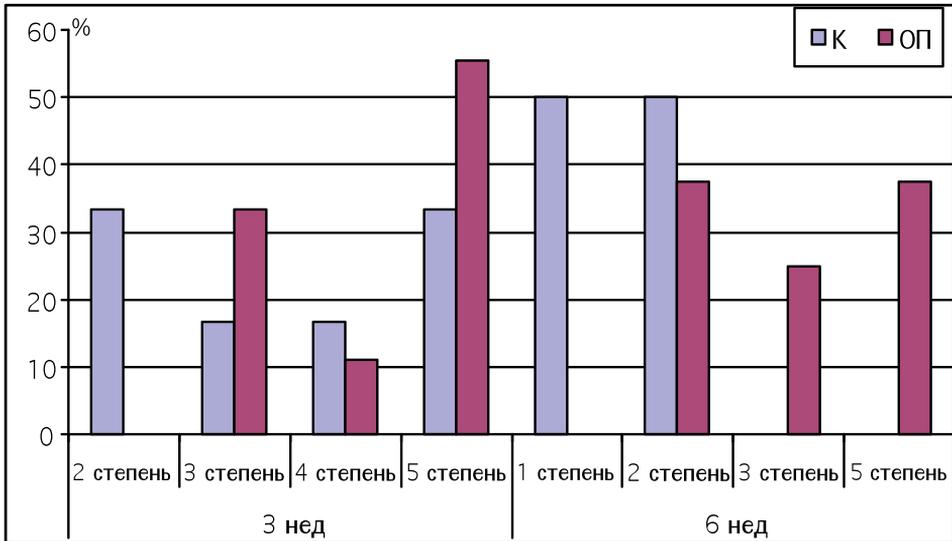


Рис. 10. Частота встречаемости различных степеней поражения тканей селезенки у мышей линии C57BL.

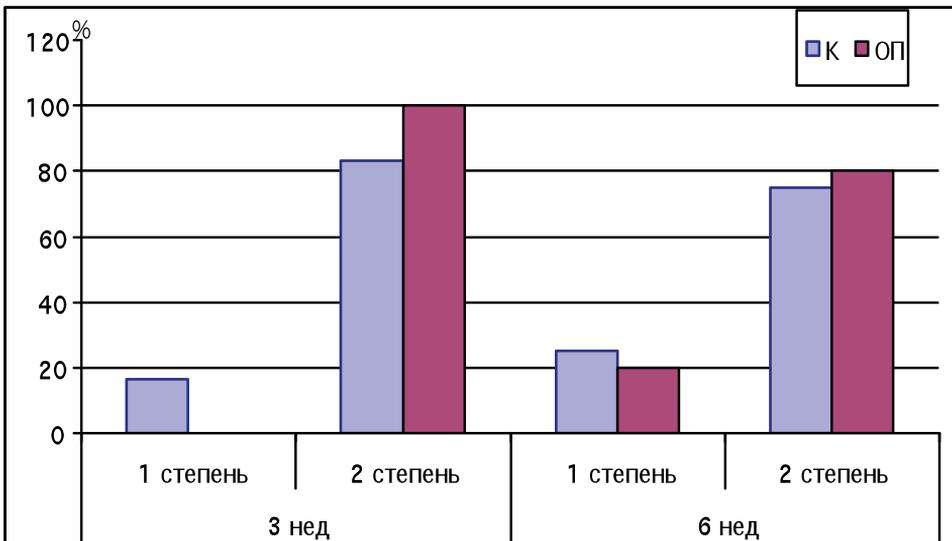


Рис. 11. Частота встречаемости различных степеней поражения тканей поджелудочной железы у мышей линии C57BL.

Заключение

Таким образом, проведенное сравнение чувствительности мышей разных линий к гамма-облучению в острой дозе 750 рентген показывает, что, несмотря на сходство общих реакций тканей и органов, существуют отличия между линиями, выраженность которых определяется их индивидуальными особенностями. Было показано, что мышцы линии С57ВL реагируют на облучение намного позже, чем мышцы линий 101/Нf и С3Н/ Sn, при этом их адаптивность достаточно высока. У мышей линий 101/Нf и С3Н/ Sn острая лучевая болезнь развивается схожим образом, однако линия С3Н/ Sn лучше всех выходит из радиационного кризиса. Заметного улучшения после развития лучевой болезни у мышей линии 101/Нf не наблюдалось.

Использование комплексных критериев позволяет увидеть суммарный результат патологического процесса и работы приспособительных механизмов, а также подобрать подходящий критерий для оценки радиочувствительности. При тестировании новых линий или гибридов использование интегральных показателей позволит определить направление и скорость развития основного патологического процесса.

Список литературы

1. *Архипова Е.Н., Алчинова И.Б., Хлебникова Н.Н., Егорова И.Ю., Бобе А.С., Семенов Х.Х., Антипов А.А., Содбоев Ц.Ц., Карганов М.Ю.* Межлинейные особенности физиологических реакций на разных уровнях организации у мышей при остром облучении // Биомедицина. 2011. № 4. С. 43-48.
2. *Кудряшов Ю.Б.* Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: ФИЗМАТЛИТ. 2004. 448 с.
3. *Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А.* Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наукова думка. 1987. 256 с.
4. *Лилли Р.* Патологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир. 1969. 146 с.
5. *Лильн И.Г., Полетаева И.И., Безикоева Ф.З., Иванов В.И.* Поведение мышей линии 101/Н – модели наследственных заболеваний человека с хромосомной нестабильностью // Генетика. 1992. Т. 28. № 3. С. 87-97.
6. *Мазурик В.К., Михайлов В.Ф.* Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 3. С. 272-289.
7. *Меркулов Г.А.* Курс патологистологической техники. Л.: Медицина. 1969. 424 с.
8. *Нягу А.И., Логановский К.Н.* Нейропсихиатрические эффекты ионизирующих излучений. Киев: Чернобыльинтеринформ. 1998. 287 с.
9. Радиация и патология / Под общ. ред. А.Ф. Цыба. М.: «Высшая школа». 2005. 341 с.
10. *Степанова О.И.* Метод взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей // Биомедицина. 2006. № 2. С. 137-139.
11. *Яновский Д.Н., Чепелева М.А.* Атлас клинической гематологии: краткое руководство для работников клинических лабораторий. Киев: Здоровье. 1967. 31 с.
12. *Karganov M., Skalny A., Alchinova I., Khlebnikova N., Grabeklis A., Lakarova E., Eisazadeh S.* Combined use of laser correlation spectroscopy and ICP-AES, ICP-MS determination of macro- and

trace elements in human biosubstrates for intoxication risk assessment. – Trace elements and electrolytes. 2011. V.28. № 2. P. 124-127.

13. *Karganov M., Alchinova I., Arkhipova E., Skalny A.V.* Laser Correlation

Spectroscopy: Nutritional, Ecological and Toxic Aspects. In: “Biophysics”. A.N. Misraed.-InTech. ISBN 2012. 978-953-51-0376-9. P.1-16.

14. <http://donat.kiev.ua/klin9.aspx>

Features organismal response of mice of different lines to acute gamma-irradiation

Yu.S. Medvedeva, E.N. Arkhipova, I.B. Alchinova, M.A. Ozerova, A.S. Bobe, C.C. Sodboev, A.A. Antipov, M.Yu. Karganov

Exposure to ionizing radiation leads to exhaustion of the pool of stem cells, increases differentiated cell stress, and activated reparation and apoptosis processes. Apart from well-documented acute effects, radiotherapy leads to delayed effects manifesting in few years after successful treatment. The aim of our study was the development of a test battery for evaluation of irradiation aftereffects in organisms characterized by different radiosensitivity. In C3H/Sn and 101/Hf mice, light scattering spectrum was shifted towards small particles, while in C57BL mice increased contribution of large particles was observed. In 3 weeks, a shift towards larger particles was recorded in all three mouse strains, but its degree varied. By week 6, the histograms approached the control. Histological study showed that the incidence of severe injuries in the liver increased by the end of the experiment in C57BL mice (but not in other mouse strains). The same shifts were observed in the pancreas and an opposite tendency was seen in the spleen. Thus, C57BL mice responded to irradiation later than C3H/Sn and 101/Hf mice, but demonstrated high adaptation capacity. C3H/Sn mice best of all recovered from the radiation crisis.

Key words: irradiation, strain-specific differences, laser correlation spectroscopy.