

Гематологические механизмы радиационного поражения

УДК 636.32/.38:619:57.043:591.111.1

doi: 10.15389/agrobiology.2013.4.115rus

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНЕГО γ -ИЗЛУЧЕНИЯ НА ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В ЛИМФОЦИТАХ И ТРОМБОЦИТАХ ОВЕЦ**Т.С. ШЕВЧЕНКО**

Воздействие γ -излучения вызывает модификацию функционирования универсальных систем внутриклеточной регуляции — циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), Ca^{2+} -кальмодулиновой и др., что приводит к изменениям различных биохимических процессов в клетке, выявленным у лабораторных и сельскохозяйственных животных. Известно, что при облучении ядродержащих клеток происходит деградация хроматина и ДНК и угнетение белкового синтеза. В то же время имеются сведения об увеличении количества белка в лейкоцитах и тимоцитах крыс при действии рентгеновского и γ -нейтронного излучений. Данные о содержании белка в клетках периферической крови сельскохозяйственных животных практически отсутствуют. Исследовали общее содержание белка в лимфоцитах и тромбоцитах, выделенных из периферической крови овец породы прекос и величину фотометрического показателя клеток. Животных подвергали воздействию тотального внешнего γ -излучения в дозах 2 и 4 Гр. Облучение овец вызывало повышение общего содержания белка в 1,7-4,7 раза на 1-30-е сут и фотометрического показателя в 1,4-3,6 раза на 1-10-е сут у лимфоцитов, тогда как у тромбоцитов исследуемые параметры практически не имели достоверных отличий от контрольных значений на протяжении всего срока исследования (30 сут).

Ключевые слова: овцы, внешнее γ -излучение, лимфоциты, тромбоциты, общее содержание белка, фотометрический показатель.

Характерной особенностью действия внешнего γ -излучения на организм млекопитающих в дозах 1-10 Гр является поражение системы кроветворения, которое сопровождается гибелью радиочувствительных клеток костного мозга и периферической крови (1-3). В механизмах повреждения и гибели клеток особая роль принадлежит универсальным системам внутриклеточной регуляции — циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), Ca^{2+} -кальмодулиновой и др. (4, 5). Воздействие γ -излучения вызывает модификацию функционирования указанных мессенджерных систем, что приводит к изменениям различных биохимических процессов в клетке, выявленным у лабораторных (6) и сельскохозяйственных животных (7-9). Кроме того, при облучении ядродержащих клеток происходит деградация хроматина и ДНК, нарушение транскрипции, угнетение белкового синтеза и, наконец, снижение содержания белка в клетках (2, 10).

В то же время имеются сведения об увеличении количества белка в лейкоцитах и тимоцитах крыс при действии рентгеновского и γ -нейтронного излучений в дозах соответственно 7 и 8 Гр (11, 12). Данные о содержании белка в клетках периферической крови сельскохозяйственных животных практически отсутствуют.

В связи с этим целью работы стало исследование общего содержания белка в лимфоцитах и тромбоцитах овец при действии внешнего тотального γ -излучения.

Методика. Исследования проводили на 32 овцах породы прекос, имеющих живую массу $32,35 \pm 0,08$ кг. Животных содержали в условиях вивария Всероссийского НИИ сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии (г. Обнинск). Рацион овец был сбалансирован по основным питательным веществам согласно нормам Всероссийского НИИ животноводства (г. Москва). Животных подвергали воздействию тотального внешнего γ -излучения (2 и 4 Гр при мощности дозы 1 Гр/ч). Облучение выполняли на установке «ГУЖ-24» (Россия) (источник излучения ^{137}Cs с энергией γ -квантов 0,67 МэВ). Контроль за уровнем и равномерностью облучения

подопытных особей осуществляли дозиметром VAJ-18 (Германия) со сферической ионизационной камерой VAK-253 (Германия). Неравномерность γ -поля не превышала $\pm 15\%$. Животных разделили на три группы — контрольную (необлученные, или интактные, овцы — 10 гол.) и две опытные (по 11 гол. в каждой). Особей из опытных групп обследовали до и на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 15-е, 20-е, 25-е и 30-е сут после облучения. В эти же сроки выполняли исследования в контрольной группе овец.

Кровь отбирали из яремной вены. Антикоагулянтом служил цитрат натрия в конечной концентрации 0,38 %. Популяции тромбоцитов и лимфоцитов выделяли по методу, описанному ранее (13). Изолированные клетки 2 раза промывали в среде, содержащей NaCl, KCl, K_2HPO_4 , $MgCl_2$, глюкозу и N-2-(гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту (соответственно 145; 5; 0,5; 1; 3 и 10 мМ; pH 7,4). Подсчет клеток в полученных суспензиях проводили в камере Горяева, жизнеспособность оценивали в тесте с трипановым синим. Общее содержание белка в клеточных популяциях тромбоцитов и лимфоцитов определяли по Лоури (14), величину фотометрического показателя — по методу, описанному ранее с использованием спектрофотометра СФ-26 (Россия) при $\lambda = 600$ нм (15). Кроме того, в опыте учитывали общее состояние, поведение, реакцию на внешние раздражители, аппетит, температуру тела, частоту пульса и дыхания животных, функциональное состояние желудочно-кишечного тракта, динамику живой массы, продолжительность жизни и гематологические показатели, используя общепринятые способы.

Статистическую обработку результатов осуществляли по *t*-критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel 2003. Различия между контрольными и опытными значениями считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Воздействие внешнего γ -излучения на организм овец в сублетальной (2 Гр) и полулетальной (4 Гр) дозах вызывало развитие острой лучевой патологии различной степени тяжести. Данные клинических и гематологических исследований указывали на то, что при дозе облучения 2 Гр отмечалась лучевая болезнь в легкой, при 4 Гр — поражение средней степени тяжести. В периферической крови животных число лимфоцитов и нейтрофилов снижалось в первые сутки после облучения в сублетальной и полулетальной дозе (соответственно на 12-15 и 25-30 %). В период разгара острой лучевой патологии (15-е сут) наблюдали более резкое уменьшение содержания лимфоцитов и нейтрофилов: соответственно на 25-30 % и 45-50 % при воздействии в дозах 2 и 4 Гр.

Жизнеспособность клеток в анализируемых популяциях лимфоцитов и тромбоцитов в тесте с трипановым синим была на уровне 90-95 %, что считается хорошим результатом выделения.

Общее содержание белка в клетках крови контрольных овец составляло для лимфоцитов — $1,32 \pm 0,24$ мг/ 10^7 кл., для тромбоцитов — $1,25 \pm 0,20$ мг/ 10^9 кл. (табл. 1). Этот показатель у животных из контрольной группы оставался стабильным в течение 30 сут исследования.

При действии γ -излучения в сублетальной дозе отмечали тенденцию к повышению общего содержания белка в лимфоцитах на 1-5-е сут; на 7-е и 10-е сут выявили увеличение показателя соответственно в 3,74 и 4,62 раза, на 15-е сут — в 1,86 раза, на 20-е и 30-е сут — в 3,33 и 2,75 раза относительно контроля (см. табл. 1). При облучении овец в полулетальной дозе наблюдали увеличение количества белка в лимфоцитах на 1-е и 3-и сут — соответственно в 1,96 и 1,72 раза, на 5-е и 7-е сут — в 4,72 и 2,94 раза, 10-е и 15-е сут — в 4,67 и 3,23 раза.

Следовательно, радиационное воздействие на организм животных в сублетальной и полулетальной дозе вызывало увеличение общего содержа-

ния белка в лимфоцитарной популяции клеток в 1,7-4,7 раза. Количество белка в лимфоцитах повышалось как в латентную фазу, так и в период разгара острой лучевой патологии животных, то есть на протяжении всего исследования. Максимальные отклонения показателя от контроля отмечали при действии γ -излучения в сублетальной дозе на 7-30-е сут и полулетальной — на 5-15-е сут. Наиболее выраженный характер изменений содержания белка в лимфоцитах наблюдали в варианте с полулетальной дозой.

1. Общее содержание белка в лимфоцитах и тромбоцитах у овец породы пре-коч в зависимости от дозы внешнего γ -излучения ($X \pm x$, виварий Всероссийского НИИ сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии, г. Обнинск)

Срок исследования, сут	Доза внешнего γ -излучения, Гр		Контроль
	2	4	
	Л и м ф о ц и т ы, мг/10 ⁷ кл.		
До облучения	1,28±0,31	1,36±0,16	1,32±0,24
1	1,59±0,63	2,51±0,31*	1,28±0,11
3	1,29±0,16	2,15±0,18*	1,25±0,20
5	1,89±0,88	6,09±0,88*	1,29±0,12
7	4,90±0,35*	3,85±0,23*	1,31±0,08
10	5,91±1,01*	5,98±0,66*	1,28±0,12
15	2,31±0,82*	4,01±0,54*	1,24±0,19
20	4,20±0,16*	—	1,26±0,13
30	3,69±0,35*	—	—
	Т р о м б о ц и т ы, мг/10 ⁹ кл.		
До облучения	1,26±0,22	1,24±0,17	1,25±0,20
1	1,24±0,36	1,29±0,28	1,29±0,23
3	1,35±0,29	1,32±0,19	1,30±0,18
5	1,28±0,31	1,38±0,28	1,28±0,22
7	1,32±0,23	1,41±0,32	1,23±0,30
10	1,37±0,33	1,64±0,47	1,27±0,17
15	1,31±0,28	1,47±0,27	1,32±0,21
20	1,28±0,26	1,39±0,25	1,28±0,26
30	1,29±0,23	1,28±0,29	—

Примечание. Контроль — показатели в контрольной группе животных, не подвергавшейся воздействию излучения. Прочерк означает отсутствие данных.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В то же время тромбоциты овец, облученных в дозе 2 и 4 Гр, во все периоды лучевой патологии практически не имели достоверных отличий этого показателя от контрольных значений (см. табл. 1).

Таким образом, развитие острого лучевого поражения у овец при действии γ -излучения в сублетальной и полулетальной дозе приводило к повышению количества белка в лимфоцитах при отсутствии аналогичных изменений в тромбоцитах. Подобное радиоиндуцированное увеличение общего содержания белка в лимфоцитах может быть обусловлено либо усилением его синтеза *de novo*, либо изменением морфологического состава лимфоидной популяции клеток в периферической крови животных. Для выяснения причины отмеченного возрастания количества белка было проведено определение фотометрического показателя лимфоцитов, который коррелирует с размером (диаметром) клеток в суспензии (16).

У контрольных животных значения фотометрического показателя для лимфоцитов составляли $0,125 \pm 0,007$ отн. ед./10⁶ кл., для тромбоцитов — $1,15 \pm 0,07$ отн. ед./10⁸ кл. и были стабильными в течение 30 сут исследования. Действие γ -излучения в сублетальной и полулетальной дозе приводило к повышению фотометрического показателя лимфоцитов в начальный период лучевой патологии. На 1-е сут после облучения овец в дозах 2 и 4 Гр его величина возросла относительно контроля соответственно в 3,18 и 3,56 раза (табл. 2). На 3-и, 5-е и 10-е сут в обеих группах животных значения показателя были выше контроля соответственно в 1,75; 1,53 и 1,36 — при воздействии в дозе 2 Гр и в 1,86; 1,75 и 2,04 раза — в дозе 4 Гр. В последующие сроки (15-30-е сут) показатели для лимфоцитов практически не отличались от контрольных.

2. Фотометрический показатель ($\lambda = 600$ нм) лимфоцитов и тромбоцитов у овец породы прекокс в зависимости от дозы внешнего γ -излучения ($X \pm x$, варианты Всероссийского НИИ сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии, г. Обнинск)

Срок исследования, сут	Доза внешнего γ -излучения, Гр		Контроль
	2	4	
	Л и м ф о ц и т ы, отн. ед./ 10^6 кл.		
До облучения	0,127 \pm 0,006	0,123 \pm 0,008	0,125 \pm 0,007
1	0,375 \pm 0,019*	0,420 \pm 0,023*	0,118 \pm 0,019
3	0,214 \pm 0,034*	0,227 \pm 0,012*	0,122 \pm 0,011
5	0,193 \pm 0,026*	0,220 \pm 0,009*	0,126 \pm 0,009
10	0,178 \pm 0,022*	0,267 \pm 0,011*	—
15	0,124 \pm 0,009	0,106 \pm 0,014	0,127 \pm 0,015
20	0,117 \pm 0,008	0,109 \pm 0,006	0,123 \pm 0,018
25	0,127 \pm 0,012	0,136 \pm 0,018	0,117 \pm 0,013
30	0,125 \pm 0,013	0,158 \pm 0,009	0,141 \pm 0,023
	Т р о м б о ц и т ы, отн. ед./ 10^8 кл.		
До облучения	1,16 \pm 0,07	1,14 \pm 0,06	1,15 \pm 0,07
1	1,18 \pm 0,08	1,12 \pm 0,05	1,21 \pm 0,09
3	1,09 \pm 0,06	0,93 \pm 0,04	1,23 \pm 0,06
5	0,95 \pm 0,07	0,71 \pm 0,09*	1,16 \pm 0,12
10	0,89 \pm 0,12	0,77 \pm 0,10*	—
15	0,94 \pm 0,06	0,92 \pm 0,04	1,19 \pm 0,09
20	1,05 \pm 0,09	0,93 \pm 0,06	1,17 \pm 0,06
25	—	—	1,14 \pm 0,08
30	1,11 \pm 0,07	1,04 \pm 0,04	1,26 \pm 0,13

Примечание. Контроль — показатели в контрольной группе животных, не подвергавшейся воздействию излучения. Прочерк означает отсутствие данных.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В обеих опытных группах наибольшие изменения фотометрического показателя лимфоцитов регистрировали на 1-е сут после облучения животных. В начальный период лучевой патологии (1-10-е сут) величина этого показателя после воздействия в полулетальной дозе была несколько выше регистрируемой при сублетальной дозе. Полученные результаты свидетельствуют о значительном (в 1,4-3,6 раза) изменении размера (диаметра) лимфоцитов периферической крови в течение первых 10 сут после облучения овец как в сублетальной, так и в полулетальной дозе.

Значения показателя у лимфоцитов овец контрольной группы при этом регистрировали практически на одном уровне.

Определение фотометрического показателя тромбоцитов у особей, подвергнутых действию γ -излучения в дозе 2 Гр, продемонстрировало отсутствие каких-либо изменений в течение 30 сут (см. табл. 2). У животных, облученных в дозе 4 Гр, его значения также мало отличались от контрольных, но при этом регистрировали их небольшое снижение на 5-е и 10-е сут. Полученные данные свидетельствуют о стабильности размера (диаметра) клеток в тромбоцитарной популяции в течение 30 сут после воздействия, кроме 5-х и 10-х сут. В эти сроки происходит выброс в кровеносное русло молодых тромбоцитарных клеток из пула костного мозга, поскольку срок жизни тромбоцитов в периферической крови составляет 5-10 сут (17).

Таким образом, развитие лучевой патологии у овец при действии γ -излучения в сублетальной и полулетальной дозе не сопровождалось изменениями величины фотометрического показателя тромбоцитов. Эти данные дают возможность полагать, что тромбоцитарная популяция в периферической крови облученных животных характеризуется постоянством размера клеток и относительной стабильностью морфологического состава.

Наряду с этим исследование популяции лимфоцитов после облучения овец выявило значительное повышение как величины фотометрического показателя на 1-10-е сут, так и содержания клеточного белка в течение всего срока наблюдения (1-30 сут). Изменения исследуемых параметров у лимфоцитов в начальный период лучевой патологии обусловлены, по-видимому, модификацией морфологического состава лимфоидных клеток

вследствие неодинаковой чувствительности их субпопуляций к действию γ -излучения. Лимфоцитарная популяция, циркулирующая в кровеносном русле периферической крови с 1-х сут после лучевого воздействия, проявляет особые свойства: она характеризуется повышенной активностью базальной и стимулированной простагландином E_1 аденилатциклазы и увеличенным содержанием Ca^{2+} (8, 9). Возможно, эта популяция клеток имеет и большую устойчивость к радиационному поражению, в связи с чем сохраняет жизнеспособность после облучения животного. Подтверждением такого предположения можно считать экспериментально установленную более высокую чувствительность к воздействию γ -излучения у В-лимфоцитов (D_0 — 1,2-1,8 Гр). В норме при сроке жизни В-лимфоцитов 1-5 сут их доля у лабораторных животных, крупного рогатого скота и телят составляет соответственно 20, 33 и 15 % от всей лимфоидной популяции (18, 19). При действии γ -излучения на организм животных в полублетальной дозе на 1-3-и сут число этих клеток в периферической крови снижается более чем на 50 % и в последующие сроки в кровеносном русле циркулирует весьма небольшая часть В-лимфоцитов (20, 21). Т-лимфоциты более радиорезистентны (D_0 для основной части Т-клеток — 2,0-2,5 Гр, но для 3-8 % популяции превышает 10 Гр), и срок их жизни составляет 200-300 сут (19). Очевидно, что в начальный период лучевой патологии в периферической крови животных происходит увеличение доли Т-клеток из-за массовой гибели наиболее радиочувствительных В-лимфоцитов. Следовательно, основная причина повышения количества белка в лимфоцитах в начальный период после облучения овец, видимо, заключается в изменении субпопуляционного состава этих клеток и росте относительного содержания Т-лимфоцитов в периферической крови животных, что подтверждается увеличением фотометрического показателя лимфоцитов на 1-10-е сут.

Однако после 10-х сут в обеих группах облученных овец отмечалось снижение величины фотометрического показателя лимфоцитов до контрольных значений, то есть размеры клеток становились такими же, как у необлученных особей. При этом общее содержание белка в клетках оставалось повышенным. Следовательно, можно полагать, что возрастание количества белка в лимфоцитах обусловлено также пострадиационным усилением его синтеза *de novo*. Имеются сведения, указывающие на возможность проявления подобного механизма: у крыс на 3-и сут после воздействия γ -излучения в дозе 7 Гр увеличивалось содержание белка в лейкоцитах (11), а при облучении в дозе 8 Гр происходили нарушения белкового синтеза и метаболизма различных белковых фракций в тимоцитах (12). Таким образом, у облученных животных повышенное содержание белка в лимфоцитах связано не только с изменением их морфологического состава и сохранением в периферической крови субпопуляции наиболее радиорезистентных Т-лимфоцитов, но и усилением в них белкового синтеза.

Итак, воздействие на овец внешнего γ -излучения как в сублетальной, так и в полублетальной дозе приводит к увеличению общего содержания белка в лимфоцитах при отсутствии изменений в тромбоцитах. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что радиационная патология сопровождается нарушением белкового гомеостаза в лимфоцитах как в начальную фазу, так и в период разгара лучевого поражения. При этом наблюдаемое повышение содержания белка в лимфоцитах обусловлено не только пострадиационной модификацией морфологического состава лимфоидной популяции в периферической крови, но и усилением белкового синтеза в этих клетках.

EFFECTS OF EXTERNAL γ -RADIATION ON THE TOTAL PROTEIN CONTENT IN LYMPHOCYTES AND THROMBOCYTES OF SHEEP

T.S. Shevchenko

All-Russian Research Institute of Radiology and Agroecology, Russian Academy of Agricultural Sciences, 109 km, Kievskoe sh., Obninsk, Kaluga Province, 239032 Russia, e-mail riar@obninsk.org, Shevchenkotatyana@yandex.ru
Received June 6, 2011 doi: 10.15389/agrobiol.2013.4.115eng

Abstract

γ -Irradiation causes a disturbance in intracellular regulation, which is effected through cyclic adenosine monophosphate (cAMP), Ca^{2+} -calmodulation, etc. That leads to changes in different biochemical cell functions observed in laboratory and farm animals. In the nucleated cells, chromatin degradation and depression of protein syntheses are known to occur after the irradiation. In contrary, there is evidence that protein content rises in rats under X-ray and γ -neutron radiation. However, we found no data on protein content in peripheral blood cells of farm animals. That is why we studied bulk protein content and the photometric parameters in lymphocytes and thrombocytes in sheep exposed to the total external γ -radiation at 2 and 4 Gy, a sublethal and half-lethal doses, respectively. In lymphocytes, the total protein content and photometric parameters after the irradiation were found to increase 1.7-4.7 times from 1 to 30 days, and 1.4-3.6 times from 1 to 10 days, respectively, with the thrombocytes parameters unchanged comparing to those in control animals for 30 days.

Keywords: sheep, external γ -radiation, lymphocytes, thrombocytes, total protein content, photometric parameter.

REFERENCES

1. Bond V., Flidner T., Arshambo D. *Radiatsionnaya gibel' mlekopitayushchikh. Narushenie kinetiki kletchnykh populatsiy* [Death from radiation in mammals. Disturbances in kinetics of cell populations]. Moscow, 1974.
2. Khanson K.P., Komar V.E. *Molekulyarnye mekhanizmy radiatsionnoi gibli kletok* [Molecular mechanisms of cell death under exposure to radiation]. Moscow, 1985.
3. Zherbin E.A., Chukhlovin A.B. *Radiatsionnaya gematologiya* [Radiation hematology]. Moscow, 1989.
4. Sobolev A.S. *Radiatsionnaya khimiya tsiklicheskih nukleotidov* [Radiation chemistry of cyclic nucleotides]. Moscow, 1987.
5. Farber J.I. The role of calcium in cell death. *Life Sci.*, 1981, 29(13): 289-295.
6. Sobolev A.S. *Problemy prirodnoi i modifitsirovannoi radiochuvstvitel'nosti* [Natural and modified sensitivity to radiation]. Moscow, 1983: 205-212.
7. Shevchenko A.S. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 1988, 6: 124-125.
8. Shevchenko T.S., Konopleva I.V. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2008, 4: 75-79.
9. Shevchenko T.S., Konopleva I.V. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 2: 63-67.
10. Gaziev A.I. *Radioekologiya*, 1999, 39(6): 630-638.
11. Naumenko L.A., Dokshina G.A. *Radiobiologiya*, 1985, 25(1): 99-103.
12. Domashenko A.D., Umanskiy S.R. *Radiobiologiya*, 1984, 24(1): 76-79.
13. Shevchenko T.S. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2007, 6: 123-126.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L., Randall R.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265-275.
15. Shevchenko T.S., Shevchenko A.S. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 1999, 4: 114-118.
16. Sungurov A.Yu. *Itogi nauki i tekhniki (VINITI, ser. «Tsitologiya»)* [The results of science and technologies], 1985, Vol. 4: 1-145.
17. Ebbel S. Origin production and life-span of blood platelets. In: *The Circulating platelet*. S.A. Jonson (ed.). NY-London, Academic Press, 1971: 19-39.
18. Radchenkov V.P., Khloponin V.S. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2005, 2: 23-31.
19. Yarilin A.A. *Immunologiya*, 1988, 5: 5-11.
20. Budarkov V.A., Lazarev N.M. *Radiobiologiya*, 1990, 30(4): 532.
21. Sypin V.D., Egorov V.G., Bizhanov B.R. *Tezisy dokladov Vsesoyuznoi nauchnoi konferentsii «Immunnyi status cheloveka i radiatsiya»* [Proc. Conf. «Human immunity and radiation»]. Gomel', 1991: 112-113.