

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 577.1:612.112.93:611.77:615.835:599.323.4:539.1.047

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОЦЕНКИ СЕКРЕТОМА ТУЧНЫХ КЛЕТОК КОЖИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗМОЖНОГО ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАДИОМОДИФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ

© 2022 г. И. Б. Ушаков¹, А. Н. Корденко^{2,*}

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

² Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, Россия

*E-mail: akordenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.08.2021 г.

После доработки 10.11.2021 г.

Принята к публикации 22.12.2021 г.

Актуальность обусловлена необходимостью разработки методов определения индивидуальных возможностей минимизации вредных последствий действия ионизирующей радиации. Проведены эксперименты по поиску информативных показателей структуры тучных клеток для предварительной оценки индивидуальной эффективности радиозащитного действия гипоксии. Исследование выполнено на белых крысах-самцах. У части животных до основного опыта проводили однократно гипоксическую пробу, помещая в газовую смесь, содержащую 8% кислорода и 92% азота (ГГС-8). У каждой из этих крыс непосредственно перед пробой и в момент ее окончания производили биопсию кожи ушной раковины. В биоптатах определяли содержание различных форм тучных клеток, выявляемых методом метахромазии с толуидиновым синим. Через неделю все животные основной группы (81 крыса) подвергались воздействию общего γ -излучения в дозе 11 Гр под защитой ГГС-8. Крысы контрольной группы (63 крысы) облучались в той же дозе на воздухе. Оценивалась продолжительность жизни после воздействия. Подтверждено радиозащитное действие газовой гипоксической смеси, выражающееся в увеличении средней продолжительности жизни облученных крыс в 2.2 раза. Показана слабая связь между отдельными количественными характеристиками тучных клеток и продолжительностью жизни облученных животных. Создано формальное выражение уравнения регрессии количества тучных клеток на продолжительность жизни животных, облученных под защитой гипоксии. На основе регрессионного анализа выявлены группы животных, в которых проявлялось наиболее высокое радиозащитное действие гипоксии. Минимальная продолжительность жизни после облучения характерна для крыс с крайними значениями индекса реактивности тучных клеток, а все случаи выживания отмечены у крыс со средними значениями показателя. Среди них же не было ни одного животного с кишечной формой гибели. Это свидетельствует о возможности в перспективе предварительной оценки радиозащитного действия гипоксии на основе исследования функциональной активности тучных клеток.

Ключевые слова: γ -излучение, гипоксия, тучные клетки, продолжительность жизни, анализ корреляций, уравнения регрессии

DOI: 10.31857/S0869803122020096

Проблема прогнозирования радиобиологических эффектов имеет давнюю историю и остается актуальной на сегодняшний день [1–3]. Наибольшую актуальность имеют вопросы, связанные с возможностью предсказания ожидаемой эффективности способов защиты от радиации. Используемые методы прогнозирования, в основном, используют различные биохимические и биофизические показатели крови. Однако кровь является чрезвычайно лабильной средой, что может снижать эффективность прогноза отдаленных последствий облучения. Для отдаленного прогноза (дни, месяцы и годы) более надежными представляются исследования генетически обусловленных структурных компонентов организма. Проблема заключается в высокой стоимости

материала для морфологического исследования, связанной с неизбежной травматизацией при биопсии. Тем не менее кожа является легко доступным объектом, а современные методы гистологического исследования позволяют проводить исследования на материале в количестве долей грамма. При этом степень болезненности сопоставима с производимой инъекционной иглой и, по сути, нет инвазии во внутренние среды организма. К тому же, кожа представляет собой один из наиболее массивных органов человека и состояние ее компонентов может быть весьма репрезентативным для характеристики состояния всего организма.

Среди структурных компонентов кожи большой интерес вызывают тучные клетки (ТК) соединительной ткани. Преимущество этих клеток

Таблица 1. Выявляемые структурные формы тучных клеток и присвоенные им номера признаков
Table 1. Detectable structural forms of mast cells and their assigned feature numbers

Структурные формы	Номер признака (<i>v</i>)	
	до пробы	после пробы
Общее число ТК, содержащихся в 1 мм ³ сетчатого слоя дермы	1	8
Число недегранулированных ТК с гранулированной цитоплазмой	2	9
Число дегранулированных ТК с гранулированной цитоплазмой	3	10
Число ТК с признаками голокриновой секреции	4	11
Число фрагментов ТК	5	12
Число недегранулированных ТК со сплошной метахромазией цитоплазмы	6	13
Число дегранулированных ТК со сплошной метахромазией цитоплазмы	7	14

состоит в возможности их четкой идентификации и важной роли в процессах гуморальной регуляции основной (соединительной) ткани [4, 5]. ТК рассматриваются в качестве эффектора парасимпатических влияний на микроциркуляцию [6], показано их участие в реализации антиоксидантных процессов [7], а также неоднозначная роль в процессах воспаления [8]. Интерес к использованию тестов с тучными клетками подогревается имеющимися данными об участии этих клеток в развитии постлучевых синдромов [9] и в механизмах радиомодифицирующего действия некоторых факторов [10].

Цель настоящей работы – определение возможности использования характеристик секреторма тучных клеток для исследования индивидуальных особенностей радиомодифицирующего действия гипоксии, а также экспериментальная разработка морфологических методов предварительной оценки индивидуальной эффективности радиозащитного действия гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Исследование выполнено на 144 белых крысах-самцах, полученных из питомника “Столбовая” (Чеховский р-н Московской обл.), массой 215–240 г. Эксперименты выполнены в Государственном научно-исследовательском испытательном институте авиационной и космической медицины (ГНИИИАиКМ) с соблюдением национальных и международных требований по содержанию и гуманному обращению с животными.

Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биоэтике ГНИИИАиКМ.

У 81 животного до основного опыта проводили однократно гипоксическую пробу, помещая их на 8 мин в камеры, вентилируемые газовой смесью, содержащей 8% кислорода и 92% азота (ГГС-8). У каждой из этих крыс непосредственно перед пробой и в момент ее окончания брали биопсию кожи ушной раковины. Биоптаты фиксировали в жидкости Бэкера, заливали в парафин и изготавливали гистологические срезы, в которых метахромазией с толуидиновым синим при pH 4.3 визуализировали тучные клетки [11]. В обоих биоптатах, полученных от каждого животного, подсчитывали количество ТК, в сетчатом слое дермы. При этом выделяли основные структурные единицы, отражающие различные формы секреции. Они представлены в табл. 1. Для удобства подсчета им присвоены номера признаков исследования.

Через 7 сут после гипоксической пробы всех крыс основного опыта подвергали воздействию однократного γ -облучения в дозе 11 Гр под защитой ГГС-8 на протяжении всего периода облучения (6.23 мин). Облучение проводили γ -кватами от источника ⁶⁰Co (1.25 МэВ) на установке “Хизотрон” (ЧССР). Мощность дозы облучения составила 176.5 сГр/мин. Дозиметрию проводили с помощью клинического дозиметра типа 27012 (ГДР). Подробности данных комбинированных воздействий представлены в монографии [12]. Остальные 63 крысы служили контролем и подвергались воздействию однократного общего γ -облучения в дозе 11 Гр на воздухе. В качестве критерия радиоустойчивости использовали продолжительность жизни (ПЖ) после облучения. Сравнение ПЖ выборок проводили непараметрическими методами Вилкоксона и *G*-критерия знаков. Вычисляли стандартное отклонение (σ). Статистически значимыми считали различия с вероятностью более 0.95 ($p > 95$).

При выполнении статистической обработки полученных результатов решались следующие задачи: определение индивидуальных особенностей радиозащитного действия гипоксии при дозах облучения, адекватных формированию “кишечной гибели” животных; анализ корреляций между структурными характеристиками тучных клеток и эффективностью защитного действия гипоксии; исследование характера регрессии показателей; выявление информативных признаков индивидуальных свойств тучных клеток для предварительной оценки радиозащитного действия гипоксии.

Для выявления возможной зависимости модифицированной радиоустойчивости от структурных характеристик ТК проведены также следующие статистические процедуры: анализ линейных корреляций между каждой формой ТК и ПЖ, регрессионный анализ (множественная линейная регрессия).

Таблица 2. Содержание различных структурных форм тучных клеток в сетчатом слое дермы
Table 2. The content of various structural forms of mast cells in the mesh layer of the dermis

Номера признаков (v)	Количество ТК, % ± σ	Номера признаков	Количество ТК, % ± σ
2	9.3 ± 5.85	9	9.1 ± 3.24
3	13.1 ± 4.55	10	15 ± 4.34
4	27.1 ± 7.46	11	27.5 ± 6.35
5	4.9 ± 2.3	12	4 ± 2.43
6	12.7 ± 4.26	13	13 ± 4.3
7	32.8 ± 7.3	14	31.2 ± 7.01

Кроме того, использовали алгоритм автоматической классификации объектов на заранее заданное количество классов [13]. При этом каждому из исследуемых объектов в специально выбранном пространстве E соответствует значение обобщенного признака $R(x)$, который вычисляется по формуле:

$$R(x) = \left(\sum_{i=1}^m v_i x_i^2 \right)^{1/2},$$

где x_i — значение x признака; v_i — значение весового коэффициента; m — количество признаков объектов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основном опыте выживаемость крыс за 30 сут составила 7.4% (шесть животных), средняя ПЖ

Таблица 3. Величины коэффициентов корреляции между количеством структурных форм тучных клеток и величиной продолжительности жизни

Table 3. The values of the correlation coefficients between the number of structural forms of mast cells and the value of life expectancy

Номера признаков (v)	Коэффициенты корреляции	Номера признаков	Коэффициенты корреляции
1	-0.04	8	0.23
2	0.21	9	-0.09
3	0.3	10	0.37
4	-0.31	11	0
5	-0.13	12	0.16
6	0.13	13	-0.18
7	-0.04	14	0.02

погибших — 8.2 сут. У крыс контрольной группы, облученных в той же дозе на воздухе, случаев выживания в течение 30 сут не было, а средняя ПЖ составила 3.7 сут. Таким образом, эффект радиозащитного действия гипоксии был выше в 2.2 раза. При явном радиозащитном эффекте гипоксии у большинства крыс его проявления имели существенные различия — от гибели животных на 4-е сутки после облучения до выживания свыше 30 сут.

В 9.9% случаев (восемь крыс) ПЖ животных была менее 5 сут, что согласно [14], свидетельствует о гибели в результате развития кишечного синдрома, т.е. об отсутствии реального радиозащитного эффекта гипоксии у этих особей. 39.4% животных (32 крысы) имели ПЖ более 10 сут, что исключает возможность развития у них кишечного синдрома и доказывает эффективность профилактики этого синдрома лучевой болезни гипоксией. У 46.9% животных (38 крыс) ПЖ находилась в пределах 5–10 сут, что не исключало вероятность развития у них кишечного синдрома и, следовательно, относительно невысокую радиозащитную эффективность гипоксии. Наличие такого широкого диапазона эффективности радиозащитного действия гипоксии подтверждает актуальность проблемы индивидуального прогнозирования.

При гистологическом исследовании биоптатов кожи установлено, что среднее содержание тучных клеток составляло до пробы 3.4 ($\sigma = 1.71$) клеток, а после пробы 3.09 ($\sigma = 1.4$) клеток в 1 мм³ сетчатого слоя дермы. Процентное содержание различных структурных форм представлено в табл. 2. При выявлении связей между содержанием ТК и величинами ПЖ крыс не выявлено существенных коэффициентов корреляции отдельных форм ТК и ПЖ (табл. 3). Это свидетельствует о неэффективности использования корреляций

Таблица 4. Коэффициенты уравнений регрессии между признаками ТК и ПЖ

Table 4. Coefficients of regression equations between the number of structural forms of mast cells and life span

Номера признаков (v)	Коэффициенты регрессии	Номера признаков	Коэффициенты регрессии
1	-3.5	8	6.2
2	-1.1	9	14.4
3	-0.4	10	15.9
4	-1.7	11	15.1
5	-3.1	12	15.8
6	-1	13	14.5
7	-1	14	14.6

Таблица 5. Продолжительность жизни крыс с разными значениями индекса реактивности тучных клеток (средние \pm стандартное отклонение)**Table 5.** Life expectancy of rats with different values of mast cell reactivity index (average \pm standard deviation)

Индекс реактивности (ИР)	Средняя ПЖ, сут $\pm \sigma$	Гибель в течение 5 сут, % $\pm \sigma$	ПЖ более 10 сут, % $\pm \sigma$	Выжившие более 30 сут, % $\pm \sigma$	Число крыс
101-117	9.04 \pm 3.59	7.69 \pm 3.32	46.15 \pm 22.28	0	13
118-134	10.86 \pm 5.03	9.18 \pm 2.4	39.33 \pm 15.5	0	28
135-151	14.08 \pm 4.14	0**	53.18 \pm 9.23*	18.03 \pm 6.07**	31
152-169	8.85 \pm 2.28	66.67 \pm 15.21	11.12 \pm 2.05	0	9

* Достоверно по отношению к последующей группе ($p > 0.95$); ** радиозащитный эффект гипоксии достоверен ($p > 0.95$).

для предварительной оценки радиозащитного эффекта гипоксии.

При использовании подхода, основанного на расчете обобщенной характеристики популяции ТК по величине признака $R(x)$, оптимальной классификации объектов по величине ПЖ удалось добиться, подставляя следующие коэффициенты $v_3 = 10$, $v_4 = 6$, $v_7 = 3$, $v_{10} = 10$ и $v_{11} = 6$. Обращает внимание, что соответствующие признаки характеризуют повышение количества ТК с проявлениями активной секреции (дегрануляция и по голокриновому типу) в ответ на гипоксическую пробу. Поэтому вычисленный по этой формуле обобщенный признак $R(x)$ может быть назван индексом реактивности (ИР) тучных клеток.

При подборе коэффициентов в уравнение регрессии удалось добиться определенного уровня качества по программе и алгоритму [13] (табл. 4). Обращает внимание, что наибольшие значения коэффициентов соответствуют признакам, характеризующим относительное количество ТК в биоптатах после гипоксической пробы. Это может свидетельствовать о более высокой регрессии этих признаков на ПЖ.

В нашем опыте величина ИР принимала значения от 101 до 169. Мы разделили всех животных на четыре класса с одинаковым диапазоном ИР (табл. 5). Более дробное разделение не давало возможности получить статистически значимые результаты в связи с малым количеством объектов в классах. Обращает на себя внимание, что минимальная ПЖ характерна для крыс с крайними значениями ИР, а все случаи выживания отмечены у крыс со средними значениями ИР, что согласуется с мнением [15] о высокой радиостойчивости организмов со средними значениями физиологических показателей. Все выжившие животные имели ИР в пределах от 135 до 151. Таким образом, у крыс с ИР в диапазоне от 135 до 152 радиозащитный эффект гипоксии по критерию 30-суточной выживаемости статистически достоверен. Кроме того отметим, что у крыс с ИР в этом диапазоне не было ни одного животного с ПЖ менее 5 сут, т.е., погибших от кишечного синдрома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование выявило наличие значительных индивидуальных особенностей реакции организма на ионизирующее излучение и гипоксию, а также конкретизировало некоторые из этих параметров. Установлена малая информативность отдельных особенностей организма для целей предварительной оценки радиозащитного действия гипоксии. На основе регрессионного анализа особенностей тучных клеток в исходной совокупности подопытных животных (крысы) выделен класс особей, обладающих способностью в наибольшей степени реализовывать радиозащитное действие гипоксии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даренская Н.Г. Общность реакции организма на воздействие различных физических факторов и ионизирующего излучения как основа для прогнозирования радиочувствительности организма // Радиация и организм. Обнинск, 1984. С. 26–31. [Darenskaya N.G. Obschnost reakcii organizma na vozdeistvie razlichnykh fizicheskikh faktorov i ionizirujushchego izlucheniya kak osnova dlya prognozirovaniya radiochuvstvitelnosti organizma. [The community of the organism reaction due to different physical factors and an ionizing radiation as a base for the prognizing of organism radiosensibility] // Radiatsiya i organism [Radiation and organism]. Obninsk, 1984. P. 26–31 (in Russ.)]
2. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В. и др. От эксперимента на животных – к человеку: Поиски и решения. Воронеж: Науч. книга, 2010. 237 с. [Darenskaya N.G., Ushakov I.B., Ivanov I.V. et al. Ot experimentov na Zhivotnih – k cheloveku poiski i resheniya [From the experiments in animals – to man searches and desisions]. Voronezh: Nauchnaya kniga, 2010. 237 p. (in Russ.)]
3. Быков В.Н., Гребенюк А.Н., Ушаков И.Б. Перспективы использования противолучевых средств для предотвращения эффектов, связанных со старением организма // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 5. С. 488–502. [Bykov V.N., Grebenyuk A.N., Ushakov I.B. Perspectives of using the radioprotecting procedures to illuminate the effects linked

- to the organism senisting // Radiation biologiya. Radio-ekologiya. 2019. V. 59. № 5. P. 488–502 (in Russ.)]
4. *Vukman K.V., Forsonits A., Oszyvald A. et al.* Mast cell secretome. Soluble and vesicular components // *Cell Dev. Biol.* 2017. V. 67. P. 65–73.
 5. *Dudeck A., Köberle M.O., Goldmann N. et al.* Mast cells as protectors of health // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019. № 4. P. 4–18.
 6. *Forsythe P.* The parasympathetic nervous system as a regulator of mast cell function // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 12. № 20. P. 141–154.
 7. *Abdelzاهر W.Y., AboBak A.A., Tahawy N.* Mast cell stabilizer modulates Sirt 1/Nrf2/TNF pathway and inhibits oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat model // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2020. № 20 P. 101–109.
 8. *Ribatti D., Tamma R., Ruggier S. et al.* Mast cells and primary systemic vasculitides // *Microcirculation.* 2018. № 8. E12498.
 9. *Milliat F., Francois A.* The roles of mast cells in radiation-induced damage are still an enigma // *Med. Sci. (Paris).* 2018. № 2. P. 145–154.
 10. *Гончаренко Е.Н., Граевская Е.Е., Кравцов Г.М., Ломакин Н.Н.* Механизм мобилизации биогенных аминов из тучных клеток крыс в условиях радиозащиты // *Радиобиология.* 1986. № 6. С. 631–637. [*Goncharenko E.N., Graevskaya E.E., Kravtsov G.M., Lomakin N.N.* Mechanism of mobilization of biogenic amines from rat mast cells in radiation protected conditions // *Radiobiologiya.* 1986. №6. P. 631–637. (in Russ.)]
 11. *Бухвалов И.Б., Атякшин Д.А., Павлова Т.В., Тиманн М.* Гистохимия. Воронеж: Науч. книга, 2018. 240 с. [*Buhvalov I.B., Atjakshin D.A., Pavlova T.V., Timann M.* Histochemiya [Histochemistry]. Voronezh: Nauchnaya kniga, 2018. 240 p. (in Russ.)]
 12. *Ушаков И.Б.* Комбинированные воздействия в экологии человека и экстремальной медицине. М.: ИПЦ “Издательство”, 2003. 442 с. [*Ushakov I.B.* Kombinirovannye vozdeistvia v ekologii cheloveka i ekstremalnoi meditsine [Combined effects in human ecology and extreme medicine]. M.: IPTS “Izdattsentr”, 2003. 442 p. (in Russ.)]
 13. *Киржнер О.И., Рог А.И., Быков Э.Г.* Алгоритм и программа методики контроля однородности групп медико-биологических объектов / Рукопись деп. ВИНТИ 30.05.1991. № 2274-891. [*Kirzhner O.I., Rog A.I., Bykov E.G.* Algoritm i programma metodiki kontrolya odnorodnosti grupp medico-biologicheskikh ob"ektov [Algorithm and the control method program for medico-biological objects homogeneity groups]. Ruk. Dep. VINITI. 30.05.1991. № 2274-891 (in Russ.)]
 14. *Костеша Н.Я., Даренская Н.Г.* Клинические формы лучевой болезни и роль поражения желудка в ее развитии. Томск: Изд-во Томск. Ун-та, 1980. 124 с. [*Kostesha N.Ya., Darenskaya N.G.* Klinicheskiye formy luchevooy bolezni i rol porazheniya zheludka v ee razvitii [The clinical forms of the radiation sickness and the role of stomach damage in its development]. Tomsk: Izd-vo Tomskogo universiteta, 124 p. (in Russ.)]
 15. *Поспишил М., Ваха И.М.* Индивидуальная радиочувствительность и методы ее проявления. М.: Энергоатомиздат, 1986. 108 с. [*Pospishil M., Vaha I.M.* Individualnaya radiochuvstvitel'nost' i metody ee proyavleniya [Individual radiosensitivity and methods of its exhibition]. M.: Energoatomizdat, 1986. 108 p. (in Russ.)]

The Use of the Method of Assessing the Secretoma of the Skin Mast Cells to Determine the Possible Individual Radiomodifying Effect of Hypoxia

I. B. Ushakov^a and A. N. Kordenko^{b, #}

^a *A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center FMBA of Russia, Moscow, Russia*

^b *Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russia*

[#] *E-mail: akordenko@yandex.ru*

The relevance of the work is due to the need to develop methods for determining individual opportunities to minimize the harmful effects of ionizing radiation. Experiments were conducted to search for informative indicators of the structure of mast cells to predict the individual effectiveness of the radioprotective effect of hypoxia. The study was performed on white male rats. In 81 animals, before the main experiment, a hypoxic sample was carried out once, placing in a gas mixture containing 8% oxygen and 92% nitrogen (GGS-8). In each of these rats, a biopsy of the skin of the auricle was performed immediately before the test and at the time of its completion. In the biopsies, the content of various forms of mast cells detected by the method of meta-chromasia with toluidine blue was determined. After a week, all animals of the main group (81 rats) were exposed to total γ -irradiation at a dose of 11 Gy under the protection of GGS-8. Rats in the control group (63 rats) were irradiated in the same dose in the air. Life expectancy after exposure was assessed. The radioprotective effect of the gas hypoxic mixture was confirmed, which is expressed in an increase in the average life expectancy of irradiated rats by 2.2 times. A weak relationship between individual quantitative characteristics of mast cells and the life expectancy of irradiated animals is shown. A formal expression of the equation of regression of the number of mast cells on the life expectancy of animals irradiated under the protection of hypoxia has been created. On the basis of regression analysis, groups of animals in which the highest radioprotective effect of hypoxia was manifested were revealed. The minimum life expectancy after irradiation is characteristic of rats with extreme values of the mast cell reactivity index, and all survival cases are noted in rats with average values of the indicator. Among them there was not a single animal with an intestinal form of death. This indicates the possibility of predicting the radioprotective effect of hypoxia based on an assessment of the functional activity of mast cells.

Keywords: γ -irradiation, hypoxia, mast cells, life expectancy, correlation analysis, regression equations