

УДК 575.322+621.311+615.322

В. І. Малюк, В. П. Замостян, Т. П. Куфтирєва, Л. О. Стеченко

ПОСТРАДІАЦІЙНІ ПУЛЬСАЦІЇ ПРОНИКНОСТІ МІТОХОНДРІЙ У НЕРВОВИХ КЛІТИНАХ КОРИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ (експериментальні, електронно-мікроскопічні, стереологічні докази)

Ювенільні миші опромінювались Co^{60} в дозі 7.5 рад. Ультраструктурні ефекти досліджували стереологічно впродовж 6—24 годин та 2—10 днів після опромінення. Результати засвідчили, що в пострадіаційних змінах проникності мембран метакондрій у кортикальних нейронах провідним є феномен нетривіальних пульсацій із періодичними змінами напрямків трансмембранних потоків.

1. ВСТУП

1.1. Оцінка сучасного стану проблеми

Це дослідження виконано на стику трьох проблем. Однією з них є проблема протирадіаційних засобів для мінімізації медичних наслідків Чорнобильської катастрофи. Для України (і не лише для неї) ця проблема має значення найгострішого соціального замовлення.

Підвищити ефективність стандартних фармвипробовувань, зменшити пов'язані з ними витрати, прискорити впровадження запропонованих препаратів могла б організація їх попередньої перевірки на зручних, репрезентативних і надійних тест-системах. Проте поки що не запропоновано тест-об'єктів, котрі відповідали б специфічним вимогам такого скрінінгу й одночасно мали потрібну високу чутливість до малих доз іонізуючого випромінювання. Тест-моделі, прийняті в токсикології та тератології, включно з доорганізмними тест-системами, не дозволяють подолати цю перешкоду, тому що їх не апробовано належним чином на адекватність згаданим специфічним вимогам.

Проблема протирадіаційних фармацевтичних засобів безпосередньо стосується з іншою проблемою — розробкою експериментальних імітаційних моделей патологічних процесів. Значення цього завдання для медицини не потребує ні пояснень, ані доказів. А втім, потрібно хоча б стисло прокоментувати змістовну цінність моделювання на тваринах саме для радіаційної медицини. У зв'язку з цим зазначимо, що незалежно од відмінностей в абсолютній і відносній тривалості етапів пренатального онтогенезу, їх

послідовність, як і напрями диференціації у людини і ссавців ідентичні. Тому індуковані радіацією ефекти у різних видів ссавців підпорядковуються однаковим тенденціям і спільній спрямованості за умови, якщо пошкодjuвальний агент діє на гомологічних фазах індивідуального розвитку організмів. З цього фундаментального принципу випливає виняткова пізнавальна цінність моделювання на лабораторних тваринах для радіаційної медицини. Такі досліди незамінні, передовсім, для з'ясування пошкоджень, недоступних для клінічної діагностики. Це стосується, зокрема, віддалених ефектів, що виникають внаслідок модифікації та перенесення первинних пошкоджень за складними багатоступневими мережами клітинних реакцій. Тим паче, що експериментальні моделі відкривають можливість всебічної оцінки фармацевтичних препаратів на протипроменеву активність.

Третьою є медико-екологічна проблема ефектів множинної взаємодії серед токсичних забруднювачів довкілля. На думку авторитетних експертів, саме тут зосереджуються найпекучіші, найскладніші й найважчі проблеми, що в усьому світі постали перед державним управлінням, законодавством і практикою охорони здоров'я населення й довкілля від забруднень [1, 2]. У 20 ст. створилась і продовжує нарощуватися така безмежна комбінаторика різноманітних хімічних і фізичних впливів на людину та природу, що усвідомити й передбачити в повному обсязі її несприятливі й небезпечні наслідки стає неможливо. Для України найактуальнішим є той ас-

пект проблеми, що стосується ефектів взаємодії радіації малих доз і потужностей з токсикантами. Медичні й екологічні дослідження в цьому напрямі тільки-но розпочинаються. Значною мірою їхня успішність, результативність залежатиме від того, наскільки чутливо, адекватно й репрезентативно запропоновані експериментальні екологічні маркери та індикатори відображатимуть можливі аддитивні, синергічні, антагоністичні, промоторні та ін. впливи й механізми такої взаємодії забруднень довкілля.

1.2. Засади та вихідні дані дослідження

Вихідною засадою є усвідомлення, що затримка розумового формування — це домінантна й найгрізніша вада розвитку у людей, що зазнали іонізуючого опромінення до народження, на найчутливішому пренатальному етапі онтогенезу. Цей висновок провідних експертів Національного наукового комітету США з біологічних ефектів іонізуючої радіації (BEIR-V) зроблено в їхній доповіді, поданій до Конгресу та Національної академії наук 1990 р. [3].

Центральній нервовій системі в процесі її формування й розвитку властива особливо висока чутливість до іонізуючої радіації [4]. Опромінення в ранніх фазах енцефалогенезу призводить до важких морфологічних спотворень головного та спинного мозку у щурів, мишей та мавп, викликає розлади умовно-рефлекторної діяльності, локомоції та здатності до навчання [5]. У людини найпереконливішим серед ефектів радіації є ураження саме мозку в періоді його розвитку. Документовані докази зібрано передусім завдяки систематичним, докладним обстеженням осіб, що зазнали опромінення *in utero* під час атомного бомбардування Японії. У когорті, що в останніх дослідженнях налічувала 1598 осіб, домінували глибока затримка розумового розвитку й суттєве зменшення розмірів голови. Встановлено залежність означених ефектів від строку вагітності та одержаної дози опромінення. Найвразливішими щодо наступного розумового відставання виявилися 8—15-й і дещо меншою мірою 16—25-й тижні після запліднення. У періоді найвищої чутливості (8—15-й тижні) обчислена нижня межа порогової дози становила 0,09 Гр для згрупованих даних. За уточненими оцінками, одержаними за допомогою даних нової дозиметричної системи DS 86, залежність доза — ефект визначила частоту глибокого розумового відставання 43 % для 1 Гр, а пороговий діапазон цього ефекту визначено в межах 0,2—0,4 Гр [3].

Вважають, що в ембріогенезі людини період максимальної радіаційної чутливості мозку збігається з піком проліферації та міграції не-

дозрілих нейронів у кору мозку. Саме в цьому часі радіаційна експозиція може спричинити як незворотне пошкодження, так і дезорганізацію нейронів. Такий висновок погоджується з ЯМР-дослідженнями мозку у дітей з глибокою затримкою психічного розвитку [3].

Наведеними засадами та вихідними даними визначаються актуальність, тематична спрямованість даного дослідження та вибір його об'єкта: вивчення впливу іонізуючої радіації в малих дозах на найчутливіший клітинний компонент мозку — його кортикальні нейрони — в процесі енцефалогенезу.

1.3. Обґрунтування необхідності дослідження

Дозова залежність частоти розумового відставання у осіб, опромінених пренатально, означає для ембріона можливість значно вищого ризику від радіації в малих дозах, аніж це вважалось досі. Тому, — наголошують експерти Американського комітету BEIR-V, — вкрай необхідні дальші експериментальні дослідження для поглиблення наших знань про природу таких ефектів [3].

Зібрано вже чимало експериментальних даних про ефекти радіації в ембріогенезі. Вони стосуються, зокрема, виникнення макроаномалій центральної нервової системи, порушень проліферації, міграції та деяких аспектів диференціації нейробластів, становлення провідних нервових шляхів. Меншою мірою з'ясовано вплив таких ефектів на функціональну спроможність мозку, включно зі здатністю до пізнання і навчання. Подібні визначення на експериментальних тваринах залишаються справою непростою, пов'язаною зі значними ускладненнями і труднощами.

Радіаційно-ембріологічні дослідження свідчать, що індукованим у періоді енцефалогенезу морфологічним дефектам нейронів властива виразна стабільність, що вони навіть посилюються після народження, на наступних етапах розвитку [6]. Тому в оцінках ризику опромінення населення зростає значення саме пізніх, постнатальних ефектів. Відповідно, на перший план виступає необхідність відомостей про найважливіші й, на жаль, найменш вивчені, постнатальні нейротропні ефекти. Адже саме вони в інтегральній, дефінітивній формі повинні відобразити можливості й обмеження компенсаторних процесів у стабілізації структурно-функціонального стану мозку.

Наведеними фактами й міркуваннями обґрунтовується необхідність даної роботи, пов'язаність її з постнатальним кортикогенезом, як і необхідність кількісного підходу, щоб обґрунтувати можливості використання кортикального нейрону як експериментальної клітинної мо-

делі нейротропних ефектів радіації *in vivo*. Щодо терміну “нейротропний”, то він вживається тут не в тому звуженому його розумінні, що підкреслює стислу специфіку і виключає можливість впливу відповідного чинника на будь-які інші тканинні типи чи різновиди клітин. Ми використовуємо цей термін у тому широкому значенні грецького “...тропний”, що у складних словах орієнтує на зв'язок з поняттями “зміна”, “перетворення” тощо.

1.4. Мета дослідження

Експериментальне вивчення нейротропних ефектів низької дози гама-опромінення в енцефалогенезі для визначення можливостей їх використання як екологічного маркера радіаційного забруднення середовища, оцінки компенсаторних процесів у стабілізації функціонально-структурного стану мозку та ефективності протирадіаційних фармацевтичних препаратів.

1.5. Концепція (робоча гіпотеза)

Спирається на узагальнення даних радіаційної ембріології, нейрофізіології та клінічних спостережень, а також новітніх відомостей щодо специфіки біологічних ефектів малих доз радіації [7, 8]. Формулюється в таких твердженнях.

А. Спектр та специфіка гострих і віддалених реакцій нервових клітин кори мозку на опромінення в малих дозах упродовж кортикогенезу зумовлюються їх складним структурним і функціональним становленням, що поєднує процеси проліферації, міграції, диференціації, раміфікації в докладно погодженій послідовності й спряженості, що не має аналогій в морфогенезах інших тканин та органів.

Б. Складність процесів кортикогенезу зумовлює не лише структурну та функціональну неоднорідність популяції кортикальних нейронів, а й їхню гетерогенність за чутливістю до малих доз радіації, а, можливо, й інших несприятливих екологічних чинників.

В. Загибель кортикальних нейронів не є, як це прийнято думати, єдиною причиною грізних наслідків опромінення в часі формування кори мозку; радіація в дозах, сублетальних, принаймні, для частини нейронів, здатна спричинити в мембранах пошкодження, що надовго, або ж назавжди затримують розвиток, структурну і функціональну спеціалізацію цих клітин.

Г. Якщо висока радіаційна чутливість нейронів у кортикогенезі зумовлена дійсно поєднанням процесів, зазначених у п. А, то вона не може обмежуватися лише пренатальним періодом, а продовжується і в ранній постнатальній онтогенез, коли формуються поверхневі, тобто наймолодші шари кори мозку і відростки нервових

клітин, себто завершується створення кори — найскладнішого продукту природи.

Доведення чи спростування сформульованих концептивних положень визначило завдання роботи, порядок її виконання і, зрештою, необхідність деяких додаткових спеціальних експериментів, що не були передбачені початковим планом, але суттєво розширили пізнавальний зміст та інформативну цінність результатів дослідження.

1.6. Науково-технічний рівень роботи

Визначається актуальністю, науковим та соціальним значенням проблем, пов'язаних з подоланням медичних і екологічних наслідків Чорнобильської катастрофи.

Дослідження орієнтовано на одержання нової наукової інформації на основі використання:

- ідей теорії систем та її здобутків в екології;
- високочутливого до радіації періоду кортикогенезу;
- адекватних експериментальних лінійних тварин;
- сучасних методів стереологічного електронно-мікроскопічного аналізу.

2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Об'єкт дослідження — кортикальні нейрони головного мозку (сенсомоторна зона кори) лабораторних мишей лінії BALB/c, що вирізняються відносно високою радіаційною чутливістю.

Ювенільні самки мишей віком 6—7 днів (після народження) разово опромінювались на установці РОКУС-М (заряд Co^{60} , потужність дози 45,9 р/хв, поле 20×20 см, ВДО 1 м), доза на ділянку 0,075 Гр. Рівень дози обрано за даними попередніх пілотних експериментів із опроміненням тварин у дозах 0,075; 0,10 і 0,20 Гр. Тварини забивались під рауш-наркозом через 6, 24, 72, 120, 168 і 240 год після зовнішнього разового загального опромінення. Щоб забезпечити охоплення контрольними оцінками всього періоду пострадіаційних спостережень, досліджено дві групи інтактних тварин віком 6—7 та 15 днів. Всього взято матеріал від 50 тварин.

Для електронно-мікроскопічного дослідження відбирались шматочки сенсо-моторної кори великих півкуль головного мозку (в межах лобної долі). Після декапітації тварин, матеріал фіксували 2 %-ним розчином чотириокису осмію 2 год на холоді. Об'єкти обезводнювали в етанолі зростаючої концентрації (від 70 % до 96 % при +4 °С, а починаючи з 96 % — при кімнатній температурі) та в ацетоні. Для заливки використано суміш епону з араддитом і загальноприйнятні режими. Вибір осмієвого фіксатора був продиктований тим, що він, як відомо, діє швидше, ніж глотарові суміші й не змінює

розміри мембранних структур. Із блоків виготовляли напівтонкі зрізи товщиною 1—3 мкм і забарвлювали їх толуїдиновим синім. Після ідентифікації пірамідних нейронів на оптико-мікроскопічному рівні, проводилось прицільне виготовлення ультратонких зрізів (ультра-мікротоми LKB-III та "Reichert"). Застосовано контрастування 2 %-ним розчином уранілацетату на 70 %-ному етанолі впродовж 15 хв та цитратом свинцю при тій же тривалості процедури. Зрізи переносили на електронний мікроскоп ЭМВ-100БР. Фотографування проводили при збільшеннях у 7, 10 і 20 тисяч разів.

Стереологічні ультраструктурні вимірювання виконано на напівавтоматизованій установці для обробки графічних зображень за допомогою спеціально розробленої обчислювальної програми "Органела" (НМФ Інтернаукмедвуз-ІНТЕКОН).

Враховувалися такі стереологічні показники мітохондрій:

- об'ємна густина, себто відношення об'єданого об'єму органел до одиниці об'єму цитоплазми;
- кількісна густина, тобто кількість профілів органел в одиниці об'єму цитоплазми;
- абсолютна довжина периметра для профілів органел у зрізах;
- абсолютна площа профілю;
- фактор форми, що характеризує відмінність органел від геометричної кулі, для якої цей параметр = 1.

Стосовно кожного із названих показників обчислювали середнє значення, похибку середньої, дисперсію та коефіцієнт точності, середнє для кожної окремої піддослідної тварини. На цій основі одержували об'єдані стереологічні оцінки для кожної групи тварин по кожній окремій пострадіаційній експозиції, а також для груп контрольних тварин. Статистична обробка здійснювалась за допомогою критеріїв і рекомендацій, описаних у доступних довідниках.

3. РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Пострадіаційні зміни ультраструктури Експозиція 6 год

Ультраструктурна організація пірамідних нейронів сенсомоторної зони кори головного мозку загалом однотипна. Плазматична мембрана, в основному, зберігає свою цілісність, на зрізах вона вирівняна, звивистість не спостерігається. Лише в поодиноких клітинах місцями можна бачити окремі її ділянки, що зазнають лізису. Канальці зернистої ендоплазматичної сітки (субстанція Ніссля) повсюдно розширені. На їх мембранах локально розташовані рибосоми. Полірибосоми в значній кількості представлені в гіалоплазмі. Комплекс Гольджі

виразно розвинутий. Його цистерни здебільшого ущільнені. Поруч з ними розташовуються дрібні міхурці, що на зрізах мають різноманітну форму й величину.

Мітохондріям властива варіабільність як за формою, так і за розмірами. Загалом же вони зберігають план будови, характерний для органел цього типу в нейронах. Поодинокі серед них мають окремі локальні пошкодження зовнішньої мембрани, місцями вони формують комплекси з канальцями ендоплазматичної сітки.

Поряд з описаними органелами в цитоплазмі спостерігаються мультівезикулярні тільця, поодинокі лізосоми, пероксисоми, мікротрубочки. Ядро на зрізах має еліпсоїдну форму. Воно обмежене виразно структурованою каріолемою. Внутрішня її мембрана на зрізах є вирівняна. Зовнішня має вигляд помірно складчастого контуру. Перінуклеарний простір здебільшого не розширений. У каріолемі нерівномірно розподіляються численні, добре помітні пори. Гетерохроматин більш-менш рівномірно розподілений у всій товщі ядра. Одне-два ядрця часто зміщені до периферії ядра. Безпосередньо біля них або ж поблизу внутрішньої ядерної мембрани помітні масиви гранул РНП рибосомного типу.

Експозиція 24 год

Набагато частіше, ніж у попередній експозиції, плазматична мембрана пірамідних нейронів зазнає локального лізису. Місцями локуси деструкції досягають такої величини, що через них в інтерстиції проникає частина вмісту цитоплазми. Канальці ендоплазматичної сітки залишаються розширеними, водночас вони набувають ознак фрагментованості, втрачають гранулярність і паралельність орієнтації. Тому в нейронах починає переважати вже незерниста ендоплазматична сітка на тлі зникнення субстанції Ніссля з властивою їй будовою. Елементи останньої вже не зустрічаються ні в межах перікаріона, ні в інших ділянках цитоплазми. Діктіосоми комплексу Гольджі фрагментарно розширені. Віддаль між цистернами в стопках дещо збільшена, тому їх загальний об'єм в цитоплазмі зростає. Збільшується, порівняно з попереднім строком пострадіаційної експозиції, також кількість секреторних міхурців, що загалом може свідчити про посилення функції комплексу.

Переважає більшість мітохондрій має на зрізах заокруглену, овальну, або дещо подовжену форму. Водночас вони втрачають перетяжки та вп'ячування, що спостерігались попередньо. Це, можливо, зумовлено збільшенням об'єму органел. Враження таке підкріплюється зростанням у клітинах фракції відносно збільшених

органел даного типу. До того ж, крісти в них набувають виразнішого впорядкування, з тенденцією до паралельності.

Дещо зростає, порівняно з попереднім строком, кількість мультівезикулярних тілець та лізосом. Ядро зберігає ознаки організації, що спостерігались у попередній експозиції.

Експозиція 120 год

В нейронах вже не виявляються дефекти плазматичної мембрани. Її ультраструктурна цілісність повсюдно відновлена.

Ендоплазматична сітка утворена дещо сплюсненими цистернами, на основі яких починається відновлення впорядкованої сітки субстанції Ніссля. Подекуди спостерігаються нефрагментовані каналці. Сполучаючись між собою, вони формують розгалужену сітку. Незалежно від їхньої будови, особливості, спільною для всіх компонентів ендоплазматичної сітки, є відсутність на мембранах фіксованих рибосом. Комплекс Гольджі загалом зменшується в розмірах за рахунок зменшення кількості та об'єму диктіосом, секреторних гранул, ущільнення цистерн.

Зростає гетерогенність мітохондрій — за розмірами, формою і внутрішньою будовою. Поряд з округлими на зрізах спостерігаються органели, подовжня вісь яких зігнута під кутом. Частина мітохондрій має численні, виразно структуровані, просторово впорядковані крісти. В інших же органелах спостерігаються лише поодинокі крісти без будь-якої певної орієнтації.

Ядро та каріолема не являють яких-небудь істотних змін, порівняно з першою добою пострадіаційних спостережень. Виняток становлять, хіба що, незначні, локальні розширення перінуклеарного простору.

Експозиція 168 год

Плазмалема не має будь-яких очевидних дефектів. Її виразна двоконтурність в окремих ділянках не спостерігається, очевидно, не через літчне пошкодження, а завдяки кутовому відхиленню ножа при ультратомії. Ультраструктурна організація ядра загалом схожа з тим, що спостерігалось на попередніх строках експерименту. Проте в окремих нейронах збільшена прозорість матрикса ядер для електронів. Ендоплазматична сітка повсюдно помірно розширена. Вона представлена дещо подовженими, нефрагментованими каналцями. На відміну од того, що спостерігалось у попередній пострадіаційній експозиції, на мембранах каналців фіксуються рибосоми. Зазначимо також явне кількісне зростання полісом. Ці ознаки можуть відображати активізацію біосинтетичних процесів у клітинах. Характерною додатковою рисою даної експо-

зиції є гіперплазія та гіпертрофія комплексу Гольджі. Диктіосоми його здебільшого різко розширені.

Мітохондрії продовжують зберігати поліморфізм, що зазначався на попередніх строках. Можливо, виняткову відмінність даної експозиції складають локальні ущільнення матрикса в більшості органел.

Порівняно з попередніми строками, зростають у кількості й розмірах пероксісоми та лізосоми.

Експозиція 240 год

Звертає на себе увагу різко посилений поліморфізм кортикальних нейронів. Поряд з клітинами, що ультраструктурно не відрізняються від інтактних, зустрічаються й такі, що зазнають реактивних та дистрофічних змін. Незважаючи на зазначений загальний поліморфізм, плазмалема практично повсюдно зберігає свою цілісність. Будь-яких переконливих доказів її дефектів знайти не пощастило.

Немає, мабуть, потреби в описі тут нейронів, що ультраструктурно не відрізняються од інтактних. На більшу увагу заслуговують, безперечно, клітини змінені.

Нейронам з ознаками реактивних перетворень властиві характерні зміни форми ядра. На зрізах зустрічаються різноманітні за глибиною, спрямовані у товщу ядра інвагінації ядерної оболонки, що призводить до збільшення її загальної поверхні. В окремих клітинах можна помітити структурні докази локальної літчної деструкції як зовнішньої, так і внутрішньої ядерної мембрани. В межах інвагінацій ядерної оболонки, в гіалоплазмі зосереджуються рибосоми й полісоми, але в решті цитоплазми їх представництво збіднене. Ендоплазматичну сітку представляють як поодинокі, так і зосереджені групами каналці. На їхніх мембранах розташовуються нечисленні рибосоми. Канальці незернистої сітки дещо розширені, на зрізах мають здебільшого овальну форму. Комплекс Гольджі в таких нейронах сплюснений. Його цистерни фрагментовані, кінцеві ж диктіосоми помірно розширені. Мітохондрії на зрізах мають овальну або дещо подовжену форму. Щільність їх матрикса підвищена, крісти поодинокі. Лізосоми представлені переважно мультівезикулярними тільцями. У збільшеній кількості спостерігаються відносно збільшені пероксісоми.

Щодо дистрофічно змінених нейронів можна зазначити таке.

Ядерна оболонка у зрізах на значній відстані втрачає властиву їй виразну структурованість. Розмивається звичайно чітка ультраструктурна окресленість гранул РНП. Вони конденсуються

в конгломерати різноманітної форми й величини, вивільнюючи таким чином у ядрах електронопрозорі ділянки. Подібне розшарування вмісту відбувається і в цитоплазмі. Це призводить до утворення в ній локальних нагромаджень дрібнодиспергованого матеріалу, а поруч з ними — електронопрозорих ділянок. Водночас зменшується кількісне представництво компонентів ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі, секреторних гранул в цитоплазмі. Водночас зменшуються в розмірах ці структури. Мітохондрії набувають примхливої, часом спотвореної форми. Зовнішня їх мембрана на зрізах стає звивистою. Електронна щільність матрикса посилюється. Поодинокі кристи позбавляються будь-якої впорядкованості та орієнтації. В окремих органелах додаються ознаки обмеженого внутрішнього лізису. Зменшується кількість і величина пероксисом і лізосом у таких клітинах.

3.2. Пострадіаційна кінетика стереологічних параметрів мітохондрій

Результати вимірювань стереологічних параметрів органел наведені в табл. 1 і на рис. 1.

Площа профілю мітохондрій, як можна бачити, через 6 год статистично достовірно й значно (більше, ніж на 70 %) зростає, в порівнянні з контролем, і принаймні до кінця 1-ї доби після опромінення залишається на підвищених значен-

нях. До завершення 3-ї доби досліджу цей показник мітохондрій повертається на початковий, контрольний рівень. Проте це ще не означає його стабілізації на цьому рівні. Через двоє наступних діб відбувається повторне, статистично достовірне його підвищення. В межах 120–168 год спостережень площа профілю мітохондрій, перевищивши на 25 % контрольні значення, залишається на тому підвищеному рівні. Остаточне ж повернення до контрольних значень настає лише на 10 добу спостережень.

Абсолютна довжина контуру мітохондрій у зрізах, загалом, демонструє подібну ж пострадіаційну кінетику. Проте, задія об'єктивності зазначимо, що відхилення від стану рівноваги в цьому випадку виражені не так явно, як у попередньому. Причина такої відмінності пов'язана з різницями між зіставленими параметрами як степеневими функціями (якщо двоє тіл геометрично схожі, а відстань між двома точками на поверхні одного з них відноситься до відстані між відповідними точками на поверхні другого як $1 : L$, то площі відповідних поверхонь відносяться як $1 : L^2$, а об'єми — як $1 : L^3$). З тієї ж самої, мабуть, причини відхилення периметра від вихідного рівня на 7 добу спостережень не спроможне набути статистичної достовірності, властивої показникові площі органел. Однак підкреслимо: зовсім не ці, загалом незначні,

Таблиця 1

Стереологічні параметри мітохондрій нейронів ювенільних мишенят BALB/c після гама-опромінення 0.075 Гр

Час радіаційної експозиції (год)	Площа профілю (10^3 мкм^2)	Периметр профілю (мкм)	Об'ємна густина густота (%)	Кількісна густина (в проєкції на 10^2 мкм^2)	Фактор фігури
0 (контроль)	15,7±1,0 (1,00)	1,56±0,07 (1,00)	7,3±0,8	57,1±5,4 (1,00)	0,79±0,01
6	27,0±1,6* (1,72)	1,99±0,06* (1,27)	7,2±0,7	27,1±4,2* (0,47)	0,81±0,01
24	26,0±1,1* (1,70)	1,98±0,05* (1,27)	7,8±0,5	27,7±2,3* (0,48)	0,80±0,01
72	15,8±0,8** (1,01)	1,48±0,04** (0,95)	8,0±1,0	58,0±7,6 (1,02)	0,88±0,01
120	19,4±0,9*** (1,24)	1,70±0,05*** (1,09)	6,9±0,6	40,3±5,1*** (0,70)	0,81±0,01
168	18,4±1,4* (1,17)	1,62±0,06 (1,04)	5,0±0,6*	33,8±4,5* (0,59)	0,82±0,01
240	16,0±0,7 (1,02)	1,60±0,04 (1,03)	6,9±0,6	51,5±5,0 (0,90)	0,76±0,01

Примітки:

Різниця є статистично достовірною в порівнянні з:

* — контрольним значенням ($P < 0,05$);

** — величиною, зафіксованою в попередньому спостереженні ($P < 0,05$).

Для порівняльних оцінок мінливості площі, периметра, кількісної густоти мітохондрій додатково подано в дужках відносні значення від величини відповідного параметра в контролі — 1,00 (інтактні тварини).

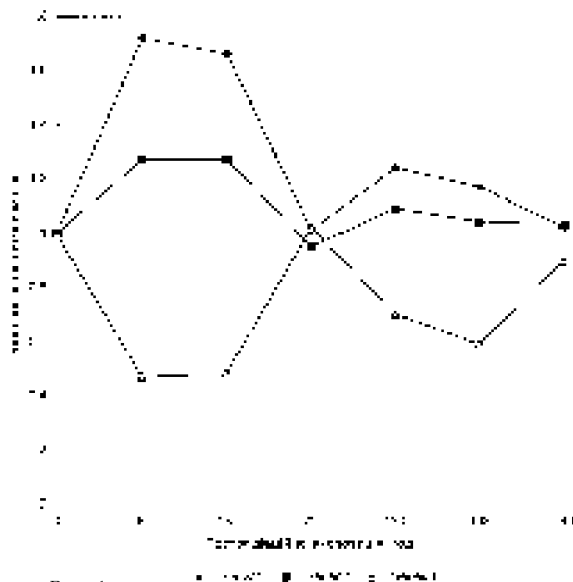


Рис. 1.

Series 1 – площа профілю мітохондрій у зрізах;
 Series 2 – периметр профілю мітохондрій у зрізах;
 Series 3 – кількісна густина мітохондрій у цитоплазмі.
 Значення параметрів подані у відносних величинах від середнього контрольного рівня (1,00).

відмінності між розглянутими стереологічними показниками визначають зміст перемін, що їх зазнають мітохондрії в нейронах після опромінення. Справжня функціональна суть отих змін, на наш погляд, в іншому. Розкривається вона тим коливальним характером пострадіаційної кінетики, що так погоджено, послідовно, синхронізовано проявляється в змінах обох параметрів мітохондрій. Та перед інтерпретацією цих змін розглянемо ще решту досліджених параметрів органел.

Середні значення питомого об'єму мітохондрій, а також фактор форми упродовж майже всього пострадіаційного періоду не зазнають статистично достовірних коливань.

Динаміка середньої чисельності мітохондрій в одиниці об'єму цитоплазми ніби дзеркально відображає коливання середніх значень площі та периметра мітохондрій. Вона зазнає істотного й статистично достовірного зменшення (більше, ніж на 50%) упродовж першої доби після опромінення. Далі показник повертається до вихідного рівня на 3 добу. Відтак відбувається його повторне зниження в інтервалі 120–168 год спостережень. Нарешті, на 10 добу середня чисельність мітохондрій, як й інші їх стереологічні параметри, усталюється на контрольному рівні.

3.3. Аналіз пострадіаційних змін мембранної проникності

Функціональний зміст кінетичних кривих

Як відомо, за нормальних умов в інтактних клітинах трансмембранні потоки, направлені ззовні, з міжклітинного середовища в клітину,

врівноважуються потоками протилежного напрямку — з клітини назовні. Завдяки такій збалансованості трансмембранних потоків інтактні клітини — за винятком хіба що скоротливих, мульткульних та екскреторних — зберігають динамічну рівновагу своїх розмірів. За тих самих умов, принципово в той же спосіб підтримуються усталені розміри мітохондріального комплексу клітин. Цей універсальний принцип збереження стабільності підтверджується в нашому випадку з високою статистичною достовірністю відтворенням значень відповідних стереологічних параметрів в обох досліджених вікових групах інтактних контрольних тварин.

Отож, пострадіаційну кінетику досліджених стереологічних показників можна розглядати як відображення розокремлених просторово, але супряжених у часі перемін проникності мітохондрій і проникності нейрона для таких трансмембранних потоків, котрі здатні викликати стереологічно відчутну розмірну модифікацію органел і цитоплазми.

Одержані стереологічні дані в їх сукупності дозволяють конкретизувати цю узагальнену функціональну оцінку. Кінетика показників абсолютної величини мітохондрій, тобто площі й периметра їхніх профілів у зрізах, відтворює переважно зміни проникності мембран самих мітохондрій. Іншими словами, вона віддзеркалює відхилення домінантних трансмембранних потоків від збалансованої рівноваги, а також перемикання їх переважальних напрямів ззовні до середини органел і з середини назовні. Кінетика питомої чисельності мітохондрій, або ж їх сумарного представництва в одиниці об'єму цитоплазми є виявленням змін у проникності плазмалеми нейрона. Нарешті в кінетиці питомого об'єму мітохондрій рефлектуються зміни в збалансованості й спрямованості превалюючих потоків через мембрани мітохондрій і через плазматичну мембрану заразом. У цьому й полягає функціональний зміст стереологічних кінетичних кривих.

Феноменологія змін мембранної проникності

Упродовж всього пострадіаційного періоду спостережень, на тлі виразно окресленої мінливості розглянутих стереологічних показників мітохондрій послідовно зберігаються стабільні значення фактора їхньої форми. Ця обставина переконує, що виявлені зміни мембранної проникності органел не локальні, не обмежені якоюсь там їх окремою фракцією. Вони є всеохопні для мітохондріального комплексу нейрона. В даному випадку на загальне радіаційне опромінення малою дозою мітохондріум реагує як одне ціле, як єдина структурно-функціональна

система. Її стереологічно зафіксована реакція — то коливальні, затухаючі, оборотні відхилення трансмембранних потоків від усталеної неколивальної рівноваги з черговими переминами їх переважального напрямку.

Феномен нетривіальних коливальних змін є, ймовірно, найістотнішим для з'ясування суті тих подій, що розгортаються після опромінення в мітохондріальних мембранах і плазмалемі нейрона. Цей феномен, можна сказати, є лейтмотивом пострадіаційної кінетики мембран у кортикальних нейронах. Започатковуються ці коливальні зміни вже в перші години після опромінення стрімким, потужним посиленням трансмембранного потоку з ергастоплазми в мітохондрії. Він і спричинює раптове й значне збільшення їхніх абсолютних розмірів. Із отим стартом, як зазначалося, синхронізовані інші події, а саме, — пропорційне зменшення чисельності мітохондрій і збереження їх усталеного сумарного об'єму в одиниці об'єму цитоплазми клітин. Події ці можуть видатися артефактом чи парадоксом хіба що на побіжний, поверховий погляд. Насправді ж вони суголосно засвідчують: водночас із мітохондріями й у тому ж напрямі приблизно пропорційно змінюється в розмірах і цитоплазма. Інакше кажучи, в перші ж години після опромінення посилюється й поступання міжклітинної рідини в цитоплазму нейрона через його цитоплазматичну мембрану.

Невідпорну аргументацію для такого тлумачення спостережень, про які йдеться, надають самі ж згадані стереологічні показники своєю наступною поведінкою. Домінування трансмембранних потоків, спрямованих іззовні в цитоплазму нейрона та в мітохондрії, над потоками протилежного напрямку не є тривалим. Вже під кінець 3-ї доби після опромінення кількісні взаємовідношення між трансмембранними потоками обох напрямів урівноважуються в обох структурах, мембранах мітохондрій і плазмалемі. Принагідно зауважимо: довершена погодженість і синхронність як порушення, так і відновлення цієї збалансованості в обох досліджених мембранних утворах упевнює, що описані зміни їх проникності збуджуються спільним для обох, одним і тим самим чинником, а реалізуються принципово ідентичним механізмом. Більше того, відновлена рівновага трансмембранних потоків в обох випадках не є тривкою й проминає одночасно. Достоту, невдовзі спливає друга хвиля змін, аналогічних за сутністю попередній. Проте амплітуда її значно менша, ніж у колишньої, а період приблизно вдвічі довший. І лише після цього налагоджується, напевне, остаточна рівновага.

Індукція коливань: запізнювання зворотного зв'язку

Причини коливальної природи виявлених змін мембранної проникності зрозуміти неможливо, не врахувавши так звані ефекти запізнювання обмежувального регуляторного чинника.

Згідно з теорією систем [див. напр., 9], їхня стабільність забезпечується регуляцією за принципом зворотного зв'язку. Петлі зворотного зв'язку можуть бути позитивними або негативними. Безмежжя петель негативного зворотного зв'язку, вбудованих у природні системи всіх рівнів організації, зменшує, пом'якшує, або сповільнює їхні зміни. Тож, коли в петлі негативного зв'язку настає істотне для системи запізнювання зворотного обмежувального сигналу, себто його затримка перевищує характерний час даної системи [10], тоді в ній виникають коливання.

За аналогією можна припустити, що природа індукованих опроміненням коливальних змін стереологічних параметрів мітохондрій і, відповідно, їхньої мембранної проникності, пов'язана з запізнюванням зворотного сигналу в петлі негативного регуляторного зв'язку. Існує, на наш погляд, цілком достатня фактична підстава для такого припущення. Вона — в утримуванні стабілізованих значень усіма дослідженими стереологічними показниками в нейронах інтактних тварин. Більше того, вона підтверджується поверненням мембранної системи нейрона на неколивальні стабілізовані рівні після збурення, викликаного малою дозою опромінення.

Поеднавши ці факти з розглянутими вище результатами дослідів і висловленими тут міркуваннями, можна зробити такі висновки:

- Регуляція проникності мітохондріальних мембран і плазмалемі в кортикальних нейронах для потоків, доступних надійній стереологічній ідентифікації, здійснюється за принципом негативного зворотного зв'язку.
- Загальне, зовнішнє, одноразове гама-опромінення в пороговій дозі (0,075 Гр) викликає тимчасовий, оборотний пошкоджувальний ефект у системі регуляції мембранної проникності кортикальних нейронів, що призводить до запізнювання обмежувального сигналу та збурення коливальних затухаючих змін інтенсивності й напрямів трансмембранних потоків.

4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

Нервовим клітинам кори головного мозку на заключному етапі її стратифікації властива винятково висока вразливість до малих доз гамарадіації. В нейронах на цій прикінцевій стадії диференціації у 1—1,5-тижневих мишей виника-

ють масштабні, системні пошкодження проникності й структури мембран після одноразового, загального, зовнішнього опромінення дозою 0,075 Гр. Ця доза є меншою від загальновизнаної порогової дози 0,09—0,10 Гр для радіаційно найчутливіших періодів внутрішньоутробного життя людини й миші.

Висока радіаційна чутливість нервових клітин в енцефалогенезі, що пов'язується з винятково складними процесами формування головного мозку, не обмежується лише пренатальним онтогенезом, як це вважається нині. Навпаки, вона не тільки утримується, а й навіть посилюється після народження, на завершальному й найвідповідальнішому етапі розвитку кори мозку, коли закінчується формування її клітинних шарів.

Стереологічний аналіз пострадіаційних змін проникності мембран нейрона на прикладі його мітохондріального комплексу дозволив одержати докази того, що мітохондріум на опромінення пороговою дозою реагує як одне ціле, як єдина структурно-функціональна система.

Регуляція проникності мітохондріальних мембран і плазмалеми в кортикальних нейронах для потоків, доступних надійній стереологічній ідентифікації, здійснюється за принципом негативного зворотного зв'язку.

Загальне, зовнішнє, одноразове гама-опромінення в пороговій дозі (0,075 Гр) викликає тимчасовий оборотний пошкоджувальний ефект у системі регуляції мембранної проникності кортикальних нейронів, що призводить до запізнювання обмежувального сигналу та збурення коливальних затухаючих змін інтенсивності й напрямів трансмембранних потоків.

У звіті наводяться перші електронномікроскопічні докази структурних пошкоджень мембран кортикальних нейронів йонізуючим опроміненням у пороговій дозі в ранньому постнатальному онтогенезі. Вперше зафіксовано наявність та послідовності градієнта таких уражень у часі і в просторовій організації нейрона, що дозволяє причинно пов'язати їх з ефектами індукованих опроміненням продуктів радіаційно-хімічних реакцій і вільнорадикальних процесів. Викликані опроміненням початкові структурні дефекти мембран є локальними в перші години після опромінення й обмежуються в цей час переважно плазматичною мембраною. Відтак, деструкція поширюється на органели цитоплазми, вражаючи, головним чином, той її компонент, що забезпечує біосинтетичні функції. Завершальною в цій низці подій є деструкція каріолеми. Характерно, що й тут спочатку знає пошкодження зовнішня ядерна мембрана, а внутрішня вражається в останню чергу. У зв'язку з означеними особливостями прогресії струк-

турних пошкоджень слід підкреслити, що, можливо, найвищу серед органел резистентність демонструють внутрішня і зовнішня обмежувальні мембрани, але не мембрани крист.

Клінічне значення одержаних даних — у тому, що вони поширюють загальновизнану верхню межу загрозливого для кортикальних нейронів періоду їх найвищої радіаційної чутливості на ранній постнатальний онтогенез, що й вимагає внесення відповідних коректив до тактики радіаційної педіатрії.

Вперше одержано переконливі ультраструктурні докази репарації дефектів, збурених у мембранах опроміненням малою дозою, а також орієнтовні оцінки швидкості процесу репарації. Зокрема показано, що структурні пошкодження плазмалеми, максимум яких припадає на 6—24 год після опромінення практично повністю репаруються під кінець 5-ої доби спостережень.

Одержані дані в їх сукупності можна розглядати як ультраструктурне обґрунтування рекомендації використовувати популяцію кортикальних нейронів 7-денних мишенят лінії BALB/c як високочутливу до йонізуючої радіації клітинну тест-систему *in vivo* для вивчення ефектів малих доз опромінення, оцінки фармпрепаратів на протипроменеву активність, як екологічний маркер ефектів взаємодії малих доз радіації і токсикантів у зовнішньому середовищі.

Переваги запропонованої тест-системи перед ембріональними тест-об'єктами забезпечуються істотним розширенням можливостей тестування при повному збереженні інформативної цінності. По-перше, дослідні випробовування переводяться з періоду пренатального онтогенезу в його постнатальний етап, чим виключається копітка визначення точних строків вагітності у лабораторних тварин. По-друге, усувається необхідність врахування можливих ефектів тісної взаємодії організмів матері та плоду, чим суттєво спрощується аналіз. По-третє, скорочуються обсяги й трудомісткість експериментальних і препаративних процедур. Таким чином, забезпечується значне скорочення часу, необхідного для виконання аналітичних досліджень і водночас зменшення їхньої вартості. Загалом, забезпечується значне зростання економічної ефективності тест-випробовувань.

У зв'язку з оцінкою наукового значення одержаних даних слід взяти до уваги, що видозалежна біологічна та генетична специфіка, природно, зумовлює певні відмінності в радіаційній чутливості між людиною та експериментальними тваринами. Незалежно від відносної тривалості органогенезу, у гризунів, на відміну од людини, ембріон змушений долати етапи клітинної проліферації та диференціації за значно

коротший час в астрономічному його обчисленні. Це, звичайно, може супроводжуватися підвищенням чутливості. До того ж, завдяки більшій швидкості ембріогенезу, у гризунів обмеження компенсаторних реакцій, зокрема в часі їх реалізації, набагато більші, ніж у людини. Отож, виникає припущення, що стосовно радіації початкові етапи онтогенезу у людини перебувають начебто в менш загрозливій ситуації, ніж у гризунів. З цією думкою, на перший погляд, узгоджуються дані про радіаційну індукцію вад розвитку. Тому при безпосередній

екстраполяції на людину мінімальної ефективної дози можлива нібито переоцінка загального ризику. Проте слід підкреслити, що для клітинноспецифічних ефектів у кортикогенезі найменші дози — порядку 0,10 Гр — є приблизно однакові як для людини, так і для експериментальних тварин. Зазначимо також, що морфологічні наслідки таких низькодозових ефектів є значно індикативнішими порівняно з біохімічними показниками на молекулярному рівні. Єдиний виняток із цього правила становлять реакції, безпосередньо пов'язані з ДНК.

Література

1. Beck B.D., Calabrese E.J. Anderson P.D. The Use of Toxicology in the Regulatory Process. In: Hayes A.W. (ed.). Principles and Methods of Toxicology. 2nd ed. Raven Press, New York, 1989, 929 p.— P. 1—28.
2. National Research Council. Principles of Toxicological Interactions Associated with Multiple Chemical Exposures. National Academy Press, Washington, D.C., 1980. Цит. за [1].
3. Beir V. Health effects of exposure to low levels to ionizing radiation.— Washington National Academy Press, 1990.— 421 p.
4. International commission on radiological protection. Developmental effects of irradiation on the brain of the embryo and fetus.— Oxford: Pergamon, 1986.— ICRP Publication 49.
5. United nations scientific committee on the effects of atomic radiation. Genetic and somatic effects of ionizing radiation.— New York: United Nations, 1986.
6. Konermann G. Postimplantation defects in development following ionizing irradiation // Advances in Radiation Biology.— San Diego: Academic press, INC, 1987.— V. 13.— P. 91—167.
7. Серкіз Я.І., Пинчук В.Г., Пинчук Л.Б. и др. Радиобиологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС.— Киев: Наукова думка, 1992.— 172 с.
8. Руднев М.И., Варецкий В.В., Береговская Н.Н. и др. Влияние низких доз ионизирующей радиации и других факторов окружающей среды на организм.— Киев: Наукова думка, 1994.— 216 с.
9. Peterson D.W. Science, Models, and Systems. In: Miller G.T. Living in the Environment: Principles, Connections, and Solutions. 9th ed. Wadsworth Publ. Co., Belmont, California, 1996, 727 p.— P. 51—69.
10. Смит Дж. Математические идеи в биологии. Пер. с англ.— М.: Мир, 1970, 179 с.

V. I. Malyuk, V. P. Zamostian, T. P. Kuftyreva, L. O. Stechenko
**POSTRADIATING PULSATIONS OF MITOCHONDRIA
PERMEABILITY IN NEURONS OF BRAIN CORTEX**

Juvenile mice were irradiated with Co^{60} rays in dose of 7.5 rad. Ultrastructural membrane effects were studied stereologically for 6–24 hours and 2–10 days after exposure. Results indicated that the main feature in postradiating changes of membrane permeability of cortical neurons mitochondria is the phenomenon of untrivial pulsations with periodical changes of dominant directions of transmembrane flows.