

ФУНКЦІОНАЛЬНА ОСОБЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА УМОВ ПРОМЕНЕВОГО УРАЖЕННЯ

Дослідження присвячено вивченню впливу іонізованого випромінювання в різних дозах і часових інтервалах на електрокінетичні властивості та гемолітичну резистентність еритроцитів, інтенсивність перекисного окислення ліпідів, антиоксидантну забезпеченість, коагуляційні властивості цих клітин.

Показано, що при гострому й фракційному іонізованому опромінюванні тварин виявляються структурні й функціональні зміни зрілих еритроцитів. Відмічено зниження інтенсивності перекисного окислення ліпідів, різноспрямовані зміни прокоагулянтних та фібринолітичних властивостей еритроцитів. Ступінь і терміни реакції еритроциту варіюють залежно від поглиненої дози і часу дослідження.

Відомо, що зрілі еритроцити є радіорезистентними клітинами [15]. Проте ряд авторів відзначає при гострій променевій патології скорочення тривалості життя еритроцитів [2], зниження їх механічної деформації [9], підвищення в'язкості жирнокислих залишків ліпідного шару [12]. У зв'язку з цим надзвичайно важливим є подальша оцінка «функціональної» радіочутливості радіостійких клітин системи крові.

Крім того, донедавна залишаються практично не дослідженими фізіологічні механізми порушення еритроцитарного ланцюга у процесі пострадіаційного виснаження і регенерації гемостазу. Проте добре відомо, що іонізоване випромінювання є одним з екстремальних факторів, які призводять до глибоких порушень функціонального стану системи гемостазу [16].

Метою дослідження було вивчення впливу іонізованого випромінювання в різних дозах і часових інтервалах на електрокінетичні властивості та гемолітичну резистентність еритроцитів, інтенсивність перекисного окислення ліпідів, антиоксидантну забезпеченість, коагуляційні властивості цих клітин.

Матеріали та методи дослідження

Наслідки опромінювання гама-квантами Co^{60} за допомогою апарата «Агат-Р» спостерігали на 80 гвінейських свинках (мурчаках). Дозу, що отримала кожна тварина, при фракційному та гострому опромінюванні, визначали за результатами розрахунків, відповідно до вимірів потужності дози клінічним дозиметром типу 21012. Похибка виміру дози становила близько 8-10 %.

У першій серії експериментів тварин піддавали одноразовому тотальному опромінюванню в дозі 4,5 Гр (сублетальна доза, ЛД 50/30). Дослідження проводили на 7-му добу (у розпал променевої хвороби) і на 35-ту добу (в період відновлення) після опромінювання. У другій серії проводили фракцій-

не гама-опромінювання Co^{60} (шість однакових доз, щодня по 1 Гр, інтервал між опромінюваннями – 24 год). Сумарна доза становила 6 Гр. У третій серії тварин піддавали гострому тотальному гама-опромінюванню у дозі 15 Гр. Кров у тварин забирали під гексеналовим наркозом з порожнини серця у шприц з 3,8 % розчином цитрату натрію.

Для вивчення електрокінетичних властивостей еритроцитів використовували модифікований метод фракційної швидкості осідання еритроцитів [13]. Гемолітичну резистентність еритроцитів вивчали за допомогою методу Гітельсона – Терехова [6].

Рівень перекисного окислення (ПО) оцінювали за початковим вмістом і накопиченням у процесі інкубації еритроцитів продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою [5]; стан антиоксидантної системи (АОС) визначали за активністю супероксиддисмутази (СОД) [3] і каталази еритроцитів [10]; церулоплазміни сироватки крові [19].

При вивченні гемокоагуляційних і фібринолітичних властивостей еритроцитів використовували стандартну безтромбоцитну субстратну плазму, в яку в контролі додавали фізіологічний розчин, а у досліді таку саму кількість субстрату, що вивчався. Еритроцити з цілісної цитратної крові виділяли шляхом центрифугування зі швидкістю 3000 об./хв протягом 30 хв з послідовним відсмоктуванням плазми і видаленням лейкоцитарної плівки. Виділені еритроцити відмивали 1 раз фізіологічним розчином методом центрифугування (1000 об./хв) протягом 20 хв [8]. У роботі використовували також еритроцити без відмивання, відмиті клітини і змив еритроцитів (супернатант). Визначали вплив червоних кров'яних тілець на час рекальцифікації [17], тромбіновий час [1], фібринолітичну активність плазми [18].

Отримані дані обробляли статистично згідно із загальноприйнятим критерієм Стьюдента [4], достовірними визнавали результати при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Виконані нами дослідження показали, що зрілі еритроцити, хоч і є радіорезистентними клітинами, проте зазнають ряд змін при опромінюванні організму. Після гострого сублетального опромінювання на 7-му добу виявлено збільшення швидкості осідання еритроцитів у 2 рази ($p < 0,01$) і появу в кровотоці клітин з високою резистентністю до солянокислого гемолітика ($p < 0,05$) (рис. 1, 2).

Висунуто припущення [2], відповідно до якого частина заряджених залишків вуглеводів переміщується із зовнішньої поверхні мембрани на 1-1,6 нм вглиб.

У мурчаків, які зазнали гама-опромінення, спостерігалось виснаження антиоксидантної системи, що проявлялося у зниженні активності супероксиддисмутази (СОД) еритроцитів (на 19,7 %, $p < 0,01$) і концентрації церулоплазміну сироватки крові (на 21,5 %, $p < 0,01$) без змін концентрації вторинних продуктів ПОЛ (табл. 1).

На нашу думку, відсутність спалаху ПО на 7-му добу після сублетального опромінення може бути пов'язана з послабленням «дихальної активності» лейкоцитів, а зниження активності

СОД еритроцитів - із зменшенням рівня $О_2^{1-}$, який виступає відносно ферменту як індукуючий і активуючий фактор [11]. Еритроцити опромінених тварин мали підвищену прокоагулянтну ($p < 0,05$), знижену антигепаринову ($p < 0,01$) і фібринолітичну активність ($p < 0,02$), що відображало конформаційні зміни високо радіочутливих жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів.

У дослідженнях, проведених через 35 діб після опромінення сублетальною дозою, виявлено відновлення електричного заряду, кислотної резистентності й активності супероксиддисмутази еритроцитів порівняно з такими показниками у розпалі променевого ураження. Концентрація церулоплазміну сироватки крові у цей період була нижче фізіологічної норми на 17,8 % ($p < 0,01$). Аналіз коагуляційних властивостей еритроцитів виявив зміни, аналогічні періоду розпаду променевого ураження, при підвищеній фібринолітичній активності цих клітин (табл. 1).

Висока прокоагулянтна і фібринолітична активність еритроцитів, імовірно, пов'язана з підвищеною здатністю еритроцитів опромінених тварин адсорбувати на своїй поверхні прокоагулянти й активатори плазміногену.

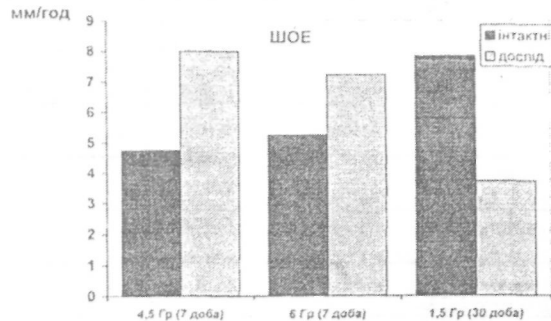


Рис. 1. Швидкість осідання еритроцитів за умов променевого ураження організму

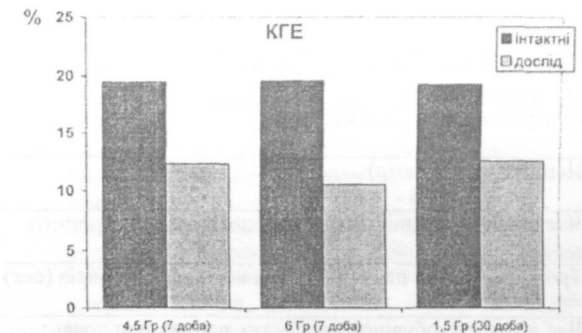


Рис. 2. Кількість зруйнованих еритроцитів при дії соляної кислоти за умов променевого ураження організму

Таблиця 1. Вплив тотального гама-опромінювання в дозі 4,5 Гр на показники перекисного окислення ліпідів та гемокоагулюючі властивості еритроцитів

Показники, що вивчалися	7 доба (М ± м)		35 доба (М ± м)	
	Інтактні тварини, n = 10	Опромінені тварини (4,5 Гр), n = 10	Інтактні тварини, n = 10	Опромінені тварини (4,5 Гр), n = 10
Перекисний гемоліз еритроцитів (%)	3,04	3,03	2,67	4,16
Приріст ТБК-активних продуктів під час інкубації еритроцитів /мкмоль/л ер./	0,17	0,29	0,18	0,15
Супероксиддисмутаза ЕД	3,08	3,61	1,51	2,01
	0,78	0,73	0,26	0,41
	0,76	0,61*	0,54	0,62*
	0,02	0,04	0,08	0,09
Церулоплазмін /мг/л/	44,70	33,50*	63,20	51,92*
	2,97	2,89	1,72	2,46
Час рекальцифікації плазми при додаванні еритроцитів /сек/	76,0	65,87*	93,40	85,77
	3,27	2,67	2,48	2,64
Тромбіновий час плазми при додаванні еритроцитів /сек/	21,0	32,0*	26,80	30,22*
	2,27	2,53	0,87	1,74
Час лізису суглобулінового згустку плазми при додаванні еритроцитів /хв./	227,4	261,5*	240,0	152,0*
	9,68	6,18	15,84	13,50

Різниця, вірогідна при $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

При фракційному опромінюванні щодня по 1 Гр, у сумарній дозі 6 Гр, загальна спрямованість змін біофізичних властивостей еритроцитів зберігалася, проте вираженість їх була меншою, ніж при гострому опромінюванні (рис. 1).

До моменту закінчення фракційного опромінювання спостерігалось підвищення первинних продуктів ПОЛ в крові на 26,6 % ($p < 0,01$), незмінний вміст ТБК-активних продуктів у процесі 1,5-годинної інкубації еритроцитів. Паралельно з цим в опромінених тварин була знижена концентрація церулоплазміну в сироватці крові (на 31,8 %, $p < 0,01$). Активність супероксиддисмутази (СОД) еритроцитів зменшилася (на 36,8 %, $p < 0,01$), тоді як каталазний індекс залишався незмінним. Не зафіксовано яких-небудь змін прокоагулянтних властивостей еритроцитів при цьому режимі опромінювання.

Слід зазначити, що хоча ступінь і терміни реакції еритроциту змінюються залежно від поглинутої дози і часу дослідження, загальна спря-

мованість радіаційного ефекту при цьому відрізняється тільки за глибиною.

У наступній серії тварин піддавали гострому тотальному гама-опромінюванню дозою 1,5 Гр.

Виявлене на 30-ту добу зменшення швидкості осідання еритроцитів (рис. 1) може бути зумовлено зниженням концентрації фібриногену (на 38,0 %, $p < 0,01$), з одного боку, і посиленням продуктивної функції кровотворення - з іншого. Збільшення швидкості відновлення еритроїдних елементів кісткового мозку і посилення виходу в кровообіг більш стійких форм еритроцитів підтвердилось при аналізі еритрограми. Наявність молодих клітин в еритроїдному ряді свідчить про наявність сильної стимуляції до процесів проліферації, яку підтверджували інші автори [7].

У цей період у групі опромінених тварин знизився перекисний гемоліз еритроцитів, рівень накопичення малонового діальдегіду ($9,08 \pm 1,31$ мкмоль/л ер.) в інтактних до $3,55 \pm 0,72$ мкмоль/л ер. в опромінених тварин; ($p < 0,01$) і концентрація церулоплазміну (табл. 2).

Таблиця 2. Вплив тотального гама-опромінення в дозі 1,5 Гр на показники перекисного окислення ліпідів та гемокоагулюючі властивості еритроцитів

Показники, що вивчалися	Інтактні тварини, $n = 10$	Опромінені тварини (1,5 Гр) 30 доба, $n = 10$
Перекисний гемоліз еритроцитів (% гемолізу)	9,09 1,03	5,48* 0,50
Приріст ТБК-активних продуктів під час інкубації еритроцитів (мкмоль/л ер.)	9,08 1,31	3,55* 0,72
Супероксиддисмутаза ЕД	0,45 0,08	0,49 0,06
Церулоплазмін (мг/л)	239,75 10,50	146,43* 12,7
Час рекальцифікації плазми при додаванні еритроцитів (сек)	81,0 1,63	94,21* 1,58
Тромбіновий час плазми при додаванні еритроцитів (сек)	40,0 1,73	38,74 1,86
Час лізису еуглобулінового згустку плазми при додаванні еритроцитів (хв)	219,5 12,13	234,7 11,54

Різниця, вірогідна при $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

Прикметно, що початковий рівень ТБК-активних продуктів у опромінених тварин значно збільшував це значення в інтактній групі ($6,38 \pm 1,38$ мкмоль/л ер. у інтактних і $14,03 \pm 1,55$ мкмоль/л ер. в опромінених тварин; $p < 0,01$).

Отже, у тварин, які зазнали опромінення, процеси ПОЛ відбулися на іншому рівні, а зниження накопичення ТБК-активних продуктів у процесі інкубації еритроцитів вказувало на виснаження субстрату, здатного до інтенсивного окислення.

Спостерігалось зниження інгібіторної активності плазми (зниження концентрації церулоплазміну на 39,1 %, $p < 0,01$), що може бути зумовлено дією токсичних речовин (продуктів деструкції клітин) на біологічно важливі молекули, насамперед біополімери генетичного апарату [14]. Проте

незмінний рівень ендогенних антиоксидантів (СОД, каталази) і знижений перекисний гемоліз еритроцитів пов'язаний, мабуть, зі збільшенням фосфоліпідних антиокислювачів і вказує на паралельне протікання репараційних процесів.

У нашому експерименті зареєстровано зниження тромбопластичної активності еритроцитів ($p < 0,01$) і посилення коагуляційного потенціалу плазми. Слід зазначити, що в усіх серіях дослідів, коли спостерігалось збільшення коагуляційної здатності плазми, посилювалися антикоагулянтні властивості еритроцитів, і навпаки.

Аналізуючи вищезазначене, можна дійти висновку, що еритроцити тварин, які зазнали іонізуючого опромінювання, втрачають свою функціональну повноцінність, що, з одного боку, може бути результатом порушення процесів кровотворення,

а з іншого – неможливо виключити пошкодження зрілих клітин крові. Варто підкреслити, що хоч ступінь і терміни реакції еритроциту змінюються залежно від поглиненої дози і часу дослідження, загальна спрямованість радіаційного ефекту при цьому відрізняється тільки за глибиною.

Висновки

1. При гострому і фракційному іонізованому опроміненні тварин виявляються структурні й функціональні зміни зрілих еритроцитів. Ступінь і терміни реакції еритроциту варіюють залежно від поглиненої дози і часу дослідження.
 2. Після гострого сублетального опромінування на 7-му добу спостерігається збільшення у 2 рази швидкості осідання еритроцитів, пригнічення фізіологічного антиоксидантного захисту, підвищення прокоагулянтної і зниження фібринолітичної активності еритроцитів.
 3. На 35-ту добу після сублетального опромінування спостерігалось відновлення швидкості осідання еритроцитів, зниження інтенсивності перекисного окислення ліпідів, послаблення антиоксидантної активності плазми, активація прокоагулянтних і фібринолітичних властивостей еритроцитів.
 4. При фракційному опромінуванні тварин летальною дозою на 7-му добу зберігається загальна спрямованість радіобіологічних змін, які спостерігаються і при гострому опромінуванні, однак їх виявлення менш виражене, ніж при одноразовій дії.
 5. Через 30 діб після опромінування дозою 1,5 Гр виявлено одночасний перебіг процесів променевого ураження і регенерації. Спостерігається збільшення електронегативності еритроцитів, виснаження субстрату для реакції ПОЛ, зниження антиоксидантної активності плазми, зменшення тромбопластинової активності еритроцитів.
1. Балуда В. П., Баркаган З. О., Гольдберг Е. Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. – Томск, 1980. – 312 с.
 2. Бишко Н. М. Гемопоз в культуре ткани in vitro у лиц, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации в результате аварии на ЧАЭС // Цитология. – 2004. – Т. 43. – № 9. – С. 842-843.
 3. Брусов О. С., Герасимов А. М., Панченко Л. Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина / Бюл. экперим. биол. и мед. – 1976. – № 1. – С. 33-35.
 4. Венчиков А. И., Венчиков В. А. Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии. – М.; Медицина, 1974. – 149 с.
 5. Владимиров О. А., Арчаков А. М. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
 6. Гительзон И. И., Терское И. А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. – Красноярск, 1959. – 247 с.
 7. Домарецкая Е. И., Старостин В. И., Детлин В. В. и др. Эффект непрерывного гамма-облучения в низких дозах на клоногенные кроветворные (КОЕ-С) и стромальные (КОЕ-Ф) клетки костного мозга // Изв. РАН. Сер. биол. – 2002. – № 4. – С. 402-406.
 8. Жиленко М. И. Изменение уровня минорных липидов эритроцитов в зависимости от степени тяжести анемии беременных // Вопросы охраны материнства и детства. – 1985. – № 8. – С. 61-63.
 9. Захаров Ю. М., Шевяков С. А. Влияние эритроцитов разной степени зрелости на пролиферативную активность эритроидных клеток «короны» эритробластических островков // Рос. физиол. ж.-л. – 2004. – № 7. – Т. 90. – С. 874-881.
 10. Методы исследований в профпатологии (биохимические) / Под ред. О. Г. Архиповой. – М. Медицина, 1988, – 207 с.

T. Zaporozhets, T. Nasonova, L. Savchenko

FUNCTIONAL ERYTHROCYTES FEATURE UNDER RADIATION INJURY CONDITIONS

The influence of ionizing radiation in various doses and hour intervals, on biophysical properties of erythrocytes, intensity of lipid peroxidation, antioxidant supply and haemostatic property of these cells was studied.

Investigation data demonstrated, that at acute and fractional ionizing irradiating of animals the structural and functional changes of mature erythrocytes are taped. The decrease of antioxidant activity of a blood, different-directional changes of pro-coagulating and fibrinolytic properties of erythrocytes is marked. Thus, degree and terms of reaction of erythron vary in dependence on an absorbed dose and time of research.