

УДК 57.043
МРНТИ: 34.17.19

**ИММОБИЛИЗАЦИЯЛЫҚ СТРЕСС АЯСЫНДА
ЕГЕУҚҰЙРЫҚТАРДАҒЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИЯ
КӨРСЕТКІШТЕРІНЕ РАДИАЦИЯНЫҢ СУБЛЕТАЛЬДЫ ДОЗАСЫНЫҢ
ӘСЕРІН БАҒАЛАУ**

Окасова А.К., Ильдербаев О.З.

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

Аңдатпа

Зерттеудің мақсаты иммобилизация стрессінің аясында иммунокомпетентті органдар мен жасушалардағы липидтердің асқын тотығу көрсеткіштеріне гамма-сәулеленудің сублетальды дозасының (6 Гр) әсерін зерттеу және бағалау. Жұмыс қырық аталық Вистар егеуқұйрықтарына жүргізіліп, төрт топқа бөлінді: I топ - бақылау; II - 25 сағаттан кейін иммобилизация стрессіне ұшыраған; III - гамма - сәулеленуге ұшыраған; IV - аралас әсерлерге ұшыраған (иммобилизациялық стресс және гамма-сәулелену). Эмоционалды күйзеліске ұшырту үшін эксперименталды жануарлар арнайы қондырғыда, 6 сағат бойы қозғалмайтын жерде, жарықта ұсталды. Тәжірибеден стресстен 25 сағаттан кейін, жеңіл эфирлік анестезия фонында декапитация арқылы алынды. III, IV топтағы жануарларды TERAGAM Со60 сәулелік терапия құралымен (ISOTREND spol. S.r.o., Чехия) әрқайсысы 6 Гр дозасында сәулелендірді. Сәулеленуге дейін эксперименталды жануарларды сәулелендіруге топометриялық және дозиметриялық дайындау жүргізілді: объект Terasix рентгендік тренажерының изоцентрлік терапевтік үстеліне қойылды (Чехия), ол өзінің дизайны мен параметрлері бойынша гамма-сәулеленушінің терапевтік үстеліне сәйкес келді. Ионды сәулелену иммобилизация күйзелісімен ұштастыра отырып, бөлек әсерге қарағанда анағұрлым айқын әсер етеді. Иммобилизация күйзелісі мен иондаушы сәулеленудің бірлескен әсері тұрақты ДК және МДА деңгейінің жоғарылауына әкеліп соқты, зерттелген объектілерде қос тотығу кернеулерінің дамуына әкелді.

Түйінді сөздер: сәулелену, иммобилизация стрессі, диен конъюгаттары, малондиалдегид, аралас әрекет.

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУБЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗЫ РАДИАЦИИ
НА ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ У КРЫС
НА ФОНЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА**

Окасова А.К., Ильдербаев О.З.

*Евразийский национальный университет им. Л.Н.Гумилева, г. Нур-Султан,
Казахстан*

Аннотация

Цель исследования — изучение и оценка влияния сублетальной дозы гамма-излучения (6 Гр) на показатели липопероксидации в иммунокомпетентных органах и клетках на фоне иммобилизационного стресса. Исследование проведено на 40 крысах-самцах линии Wistar, разделенных на 4 группы: I группа — интактные; II - подвергнутые иммобилизационному стрессу через 25 часов; III - подвергнутые гамма - облучению; IV – подвергавшиеся комбинированному воздействию (иммобилизационный стресс и гамма-излучение). Для воспроизведения

эмоционального стресса экспериментальных животных держали в специальном приспособлении, где животные находились в неподвижном состоянии в течение 6 часов, при ярких освещенных. Выводили из эксперимента через 25 часов после стресса, путем декапитации на фоне легкого эфирного наркоза. Животных III, IV группы облучали на радиотерапевтической установке TERAGAM Co⁶⁰ («ISOTREND spol. s.r.o.», Чехия) однократно, по 6 Гр. До облучения проводилась топографическо-дозиметрическая подготовка экспериментальных животных к облучению: объект помещался на изоцентрическом терапевтическом столе рентген-симулятора «Terasix» (Чехия), который своей конструкцией и параметрами соответствует терапевтическому столу гамма облучателя. Ионизирующая радиация в сочетании с иммобилизационным стрессом оказывает более выраженное воздействие, чем при раздельном действии. Влияние сочетанного воздействия иммобилизационного стресса и ионизирующей радиации привело к увеличению уровня ДК и МДА, приводящих к развитию двойного окислительного стресса в исследуемых объектах.

Ключевые слова: радиация, иммобилизационный стресс, диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, комбинированное действие.

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF SUBLETHAL RADIATION DOSE ON THE INDICATORS OF LIPOPEROXIDATION IN RATS AGAINST THE BACKGROUND OF IMMOBILIZATION STRESS

A. Okassova, O. Ilderbayev

L.N. Gumilyov Eurasian national university, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

Abstract

The aim of the study was to study and evaluate the effect of a sublethal dose of gamma radiation (6 Gy) on the parameters of lipoperoxidation in immunocompetent organs and cells against the background of immobilization stress. The study was conducted on 40 male Wistar rats divided into 4 groups: group I-intact; group II — exposed to immobilization stress after 25 hours; group III - exposed to gamma radiation; and group IV - exposed to combined exposure (immobilization stress and gamma radiation). To reproduce emotional stress, experimental animals were kept in a special device, where the animals were motionless for 6 hours, under bright lights. They were removed from the experiment 25 hours after stress, by decapitation on the background of light ether anesthesia. Animals of groups III and IV were irradiated on the TERAGAM Co⁶⁰ radiotherapy unit ("ISOTREND spol. s.r.o.", Czech Republic) once, 6 Gy. Before irradiation was carried out topographic and dosimetry preparation of experimental animals to irradiation: an object placed on the table isocentric therapy x-ray simulator "Tigah" (Czech Republic), which designs and parameters corresponds to the therapeutic table of gamma irradiator. Ionizing radiation combined with immobilization stress has a more pronounced effect than with separate action. The combined effects of immobilization stress and ionizing radiation led to an increase in the level of DC and MDA, which lead to the development of double oxidative stress in the studied objects.

Keywords: radiation, immobilization stress, diene conjugates, malondialdehyde, combined action.

Введение

Перекисное окисление липидов является цитотоксическим процессом, который восприимчив к воздействию факторов окружающей и производственной среды. При отклонениях в биохимических процессах высокие концентрации продуктов ПОЛ

повреждают мембраны клеток, наблюдается структурные и функциональные изменения клеток, которые в свою очередь вызывают клеточную гибель. Малоновый диальдегид (МДА) и диеновый конъюгант (ДК), вторичные продукты ПОЛ, токсичные соединения, являются мощными индукторами и медиаторами окислительного стресса организма [1]. Высокие дозы радиации индуцирует ПОЛ, что вызывает клеточную гибель и способствует усилению процессов аутофагии в клетках [2]. Наряду с этим при стрессе наблюдается активация ПОЛ и в связи с этим нарушение мембранных структур клеток. Возникающие при этом липемия и продукты окисления липидов могут способствовать развитию атеросклероза. Поддержание баланса между процессами свободнорадикального и перекисного окисления и состоянием антиоксидантной защиты является одной из наиболее распространенных биохимических реакций, которые протекают в организме человека и обеспечивающих его жизнедеятельность. Однако сравнительно мало изучены те изменения, которые происходят в организме с процессами перекисного окисления липидов (ПОЛ) и комбинированного действия γ -излучения на фоне иммобилизационного стресса. Тем не менее, радиация и стресс связаны между собой, причем эта связь наиболее отчетливо проявляется в периоды крупных радиационных аварий и катастроф. В таких ситуациях многие люди испытывают беспокойство, страх перед ожидаемыми (как правило, сильно преувеличенными) последствиями аварии для своего здоровья, здоровья и благополучия родных и близких. Эта беспокойность, психическая напряженность, которая является одной из главных причин и, одновременно, проявлений стресса, может нанести здоровью и социальному благополучию больших групп населения куда больше вреда, чем воздействие малых доз ионизирующего излучения.

Также в последние годы значение проблемы эмоционального стресса возрастает в связи с тем, что жизнь людей в наши дни характеризуется ускоренным темпом, информационными перегрузками, острыми или длительными конфликтными ситуациями. Механизм действия и последствия острого эмоционального стресса относятся к области малоизученных разделов частной биологической химии и практической медицины. В настоящее время практически отсутствуют сведения о реакциях различных органов и тканей (кожа, печень, головной мозг, тимус, надпочечники, селезенка) на стресс. По последним данным, стресс играет существенную роль в развитии негативных последствий облучения в организме, что имеет особое значение для состояния здоровья людей, пострадавших от радиационных аварий [3, 4, 5, 6]. Исследования показали, что стрессовый фактор модифицирует иммунный ответ организма животного на облучение ионизирующей радиацией [7, 8].

Учитывая важность окислительно-метаболических процессов в формировании патологического процесса, ее лабильность, высокую чувствительность, а также значительные последствия при ее повреждении, нам представляется интересной ее роль в формировании патологического процесса у животных при комбинированном воздействии иммобилизационного стресса и сублетальной дозы ионизирующего излучения в эксперименте. Поэтому целью нашей работы было изучение и оценка влияния сублетальной дозы гамма-излучения (6 Гр) на показатели липопероксидации в иммунокомпетентных органах и клетках на фоне иммобилизационного стресса.

Материал и методы исследования

Для реализации поставленной цели были выполнены 4 серии опытов на 40 белых крысах самцах Вистар весом 200-250 г. Животные делились на 4 группы: I

группа – интактная (n = 10), II группа – II - подвергнутые иммобилизационному стрессу через 25 часов (n = 10); III - подвергнутые гамма – облучению в дозе 6Гр (n = 10); IV – подвергавшиеся комбинированному воздействию (иммобилизационный стресс через 25 часов и гамма-излучение) (n = 10). Эксперименты на животных проводили в соответствии с Женевской конвенцией (1990) и Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным, по этическим нормам локального этического комитета университета. Для воспроизведения эмоционального стресса экспериментальных животных держали в специальном приспособлении, где животные находились в неподвижном состоянии в течение 6 часов, при ярких освещенностях. Выводили из эксперимента через 25 часов после стресса, путем декапитации на фоне легкого эфирного наркоза.

Животных III и IV группы облучали за 10 суток до исследования на радиотерапевтической установке TERAGAM Co⁶⁰ («ISOTREND spol. s.r.o.», Чехия) однократно по 6 Гр. У животных определяли продукты перекисного окисления липидов в различных органах и клетках. Для исследования выделяли лимфоциты из периферической крови и готовили гомогенаты из печени, селезенки, тимуса, лимфатических узлов тонкого кишечника и надпочечников. В них определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) [9]. Полученные результаты исследования обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики с вычислением критериев Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Как показали исследования при воздействии иммобилизационного стресса концентрация ДК увеличивается в лимфатических узлах с $0,30 \pm 0,02$ до $0,38 \pm 0,03$ ($p < 0,05$) и в тимусе с $0,44 \pm 0,03$ до $0,65 \pm 0,04$ ($p < 0,01$) (табл. 1). После облучения у животных уровень ДК во всех исследуемых органах и тканях сохраняется на повышенном уровне. У подопытных животных после стрессо-радиационного воздействия концентрация ДК в лимфоцитах периферической крови, тканях печени и селезенки, тимуса и надпочечников наблюдались существенные изменения, содержание ДК в лимфоцитах почти в 1,95 раза превышало ($p < 0,001$), в тканях печени 2,9 раза ($p < 0,001$) увеличена. Содержание диеновых конъюгатов у запыленных животных в печени и лимфоузлах тонкого кишечника показало, что в печени отмечено увеличение с $0,64 \pm 0,05$ до $3,31 \pm 0,21$ ($p < 0,001$), т.е. в 5,17 раза, а в селезенке – с $1,24 \pm 0,08$ до $3,62 \pm 0,24$ ($p < 0,001$), примерно в 2,9 раза ($p < 0,001$).

Таблица 1 – Содержание ДК в различных объектах исследования и сериях в эксперименте

Органы	Экспериментальная группа			
	I (интактная)	II (подвергнутые иммобилизацио нному стрессу через 25 часов)	III (облученны е гамма- радиацией, 6 Гр)	IV комбинированное воздействие (иммобилизационный стресс через 25 часов и гамма-излучение)
Печень	$0,64 \pm 0,05$	$3,31 \pm 0,21$ ***	$1,73 \pm 0,12$ ***	$1,87 \pm 0,16$ ***
Селезенка	$1,24 \pm 0,08$	$3,62 \pm 0,24$ ***	$2,67 \pm 0,20$ ***	$2,42 \pm 0,21$ ***
Лимфатически е узлы	$0,30 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$ *	$2,67 \pm 0,20$ ***	$0,42 \pm 0,03$ *
Тимус	$0,44 \pm 0,03$	$0,65 \pm 0,04$ **	$1,37 \pm 0,08$ ***	$1,27 \pm 0,11$ ***

Надпочечник	1,14±0,07	1,46±0,11 *	1,45±0,13 *	1,36±0,08 *
Лимфоциты периферическ ой крови	0,21±0,02	0,20±0,02	0,34±0,02**	0,41±0,03***

*Примечание: различия статистически достоверны с интактной группой: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001.*

Концентрация ДК в лимфатических узлах тонкого кишечника у животных III группы, подвергавшихся гамма-облучению, увеличивалась с 0,30±0,02 до 2,67±0,20 или в 8,9 раза (p<0,001), а в IV группе до 0,42±0,03 или в 1,4 раза (p<0,001). В гомогенатах печени у облученных животных отмечено тенденция к увеличению, когда при воздействии стрессо- радиационного фактора количества ДК увеличилась с 0,64±0,05 до 1,87±0,16 или в 2,8 раза (p<0,001). Во второй и третьей группе со стороны надпочечников существенных изменений не наблюдалось, а у животных IV группы отмечено увеличение количества диеновых конъюгатов в 1,19 раза (p<0,05).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при воздействии иммобилизационного стресса и иммобилизационно-радиационного фактора активируется свободнорадикальное окисление, возможно, это связано со снижением активности антиокислительных ферментов в большинстве изучаемых органов в этих сериях. После радиационного воздействия во всех объектах отмечено тенденция к увеличению продукта перекисного окисления липидов. Как известно, в основе активации перекисного окисления липидов лежит чрезмерная генерация активных форм кислорода, превышающая физиологические возможности антиоксидантных систем, наступающих после истощения ферментных систем. А также сочетание этих механизмов в случае действия лучевого фактора, определяемое, с одной стороны, массивной гибелью радиочувствительных клеток организма и потерей антиоксидантов, а с другой – активной генерацией инициаторов ПОЛ [8].

Таблица 2 – Содержание МДА в различных объектах исследования и сериях в эксперименте

Органы	Экспериментальная группа			
	I (интактная)	II (подвергнутые иммобилизацио нному стрессу через 25 часов)	III (облученные гамма- радиацией, 6 Гр)	IV комбинированн ое воздействие (иммобилизаци онный стресс через 25 часов и гамма- излучение)
Печень	0,13±0,01	0,33±0,03***	0,23±0,02 **	0,21±0,02 *
Селезенка	0,29±0,03	0,32±0,03	0,43±0,04 *	0,38±0,03 *
Лимфатические узлы	0,03±0,005	0,07±0,006***	0,05±0,004 *	0,05±0,004 *
Тимус	0,13±0,01	0,20±0,02 *	0,19±0,02 *	0,17±0,01 *
Надпочечник	0,19±0,02	0,24±0,02	0,23±0,02	0,22±0,02

Лимфоциты периферической крови	0,08±0,006	0,07±0,005	0,13±0,01 **	0,15±0,01 ***
<i>Примечание: различия статистически достоверны с интактной группой: * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001.</i>				

Интенсивность процессов липопероксидации в исследуемых объектах с помощью МДА у крыс подвергавшихся воздействию иммобилизационного стресса, гамма-радиации и их комбинированному действию представлена в таблице 2. Почти во всех исследованных группах содержание продукта перекисного окисления липидов МДА достоверно выше относительно контрольной группы ($p<0,05$). При воздействии стрессового фактора в лимфоцитах периферической крови содержание МДА оставалось на уровне контрольных величин, но наблюдалась некоторая тенденция к снижению на 12,5 % ($p<0,05$). А ответ на гамма-излучения отмечены увеличением количества на 62,5 % ($p<0,01$). При воздействии стрессового фактора в гомогенате печени отмечено увеличение уровня МДА в 2,5 раза % ($p<0,05$), при комбинированном воздействии на 61,5 % ($p<0,05$), а на изолированном действии гамма-радиации наблюдалось увеличение на 76,9 % ($p<0,01$). На остальных исследуемых объектах выявлено стабильное повышение содержания МДА. Так у животных при воздействии стрессового фактора концентрация МДА повышалась в лимфоузлах тонкого кишечника в 2,3 раза % ($p<0,001$), при воздействии гамма-излучения и при комбинированном воздействии (IV группа) на 66,6 % ($p<0,05$). В гомогенате тимуса наблюдалось усиление активации процессов ПОЛ, что выражалось в более высоком содержании МДА в сравнении с контрольной группой. Концентрация МДА во II группе увеличилась на 53,84 % ($p<0,05$), в III группе на 46,15 % ($p<0,05$), в IV группе на 30,76% ($p<0,05$). Аналогичная динамика отмечалась в надпочечниках и лимфоцитах крови: в надпочечниках во II группе увеличена на 26,31% ($p<0,05$), в III группе – на 21,05 % ($p<0,05$), в IV группе – на 15,78 % ($p<0,05$) и в лимфоцитах крови во II группе уменьшилось 12,5% ($p<0,05$), в III группе – на 62,5 % ($p<0,05$), в IV группе – на 87,5 % ($p<0,001$).

При радиационном поражении организма происходит предельная выработка ферментов антиоксидантной защиты, невозможность повышения уровня энзимов в ответ на усиление ионизирующего облучения и даже снижение основных факторов защиты от действия радиации. Все это обосновывается увеличением продуктов ПОЛ (первичных, затем вторичных и третичных). Накопление токсических продуктов ПОЛ происходит только после истощения антиоксидантной системы организма [8,10].

Выводы

Проведенные исследования выявили во всех исследуемых группах активацию процессов ПОЛ в объектах, что выражалось в достоверном увеличении содержания МДА и ДК. Полученные данные по изучению состояния крови и других материалов, обменных процессов в организме и других морфофункциональных показателей исследуемых животных являются важной составляющей оценки, как индикатор для выявления закономерностей и прогнозирования последствий воздействия факторов, как радиация и стресс на живые организмы.

Литература

1. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление и радиация // Киев: Наукова думка. – 1991. – С. 255.
2. Soodaeva S.K., Skotzelias E.D., Zhukov A.A., Archakov A.I. Comparative studies of superoxide generation in microsomes and reconstituted monooxygenase systems //In: Cytochrome P-450. Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications, 1982, (E.Nietanon et al., tds.), Elsevier Blomed. Press. Amsterdam. –N.Y. –Oxford. –P.615-618.
3. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Успехи соврем.биологии. – 1993. – Т.113. – С. 71-81
4. Зентов Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты /Н.К. Зентов, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньшикова. М: Наука. – 2001. – 340 с.
5. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2011. – № 1. – С. 3-19
6. Усенова О., Жетписбаев Б., Сайдахметова А. Особенности состояния перекисного окисления липидов в отдаленном периоде после фракционированного гамма-облучения // Астана медициналық журналы. – 2006. – № 2. – С. 114-117
7. Суринов Б.П., Карпова Н.А. Сочетанное воздействие ионизирующей радиации и стресса на антителогенез у мышей //Радиационная биология. Радиоэкология. - 1996. - Т. 36, Вып. 3. - С. 359-364.
8. Soylemez S. Resveratrol supplementation gender independently improves endothelial reactivity and suppresses superoxide production in healthy rats /S. Soylemez, A. Sepici, F. Akar // Cardiovascular drugs and therapy. – 2009. – V. 23, №6. – P. 449-458.
9. Конюхова С.Г., Маркин С.Г., Конюхова А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. Лабораторное дело. 1989;9:40-46.
10. Wang B, Katsube T, Begum N, Neno M. Revisiting the health effects of psychological stress—its influence on susceptibility to ionizing radiation: a mini-review. Journal of Radiation Research. 2016;57(4):325–335.