

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ГИПОТЕРМИИ ДЛЯ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

© 2007 г. Р.Я. Гордон, Д.А. Игнатъев, Е.В. Мельникова, В.В. Рогачевский, И.В. Краев, С.С. Хуцян

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области

Поступила в редакцию 09.02.06 г.

Методами флуоресцентной и электронной микроскопии показано, что белоксинтезирующая система в нейронах гиппокампа (поля СА1 и СА3) и сенсомоторной области коры головного мозга крыс, подвергнутых γ -облучению в дозе 8 Гр в состоянии гипоксии-гиперкапнии (16 – 18°C), в меньшей степени подвержена повреждениям и быстрее восстанавливается по сравнению с аналогичными нейронами крыс, облученных в нормальных условиях. Биогенез рРНК и белоксинтезирующая активность полирибосом восстанавливались у крыс, облученных в состоянии гипотермии, уже к двум суткам. Протекторное влияние гипотермии не распространялось на изменения в мембранных структурах (частичная потеря целостности и возможное трансформирование их состава), вызванные облучением, а восстановление мембранных структур (эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи) осуществляется с меньшей скоростью.

Ключевые слова: гипотермия, гипоксия, гиперкапния, ионизирующая радиация, нейроны, белоксинтезирующая система.

Функциональное состояние нервных клеток играет определяющую роль в характере воздействия ионизирующей радиации на нейроны [1]. Ранее при использовании в качестве экспериментальной модели нейронов головного мозга сусликов, у которых при входе в зимнюю спячку происходит генерализованное торможение функциональной и метаболической активности, было выявлено, что эффект облучения минимален, когда животное находилось в состоянии оцепенения, и максимален при выходе из спячки, когда в нервных клетках резко активизируются все процессы. Поскольку у незимоспящих животных отдельные нейроны поразному реагируют даже на значительные дозы облучения, можно предположить, что такая избирательность обусловлена различием в функциональном состоянии клеток в момент облучения [2,3].

Являясь достаточно эффективным способом нейрозащиты при общем кислородном голодании организма, гипотермия снижает скорости протекания метаболических процессов, подавляет функциональную активность нейронов [4], тормозит освобождение и выход нейротрансмиттеров, снижает продукцию гидроксильных

радикалов, вносит изменения в работу гематоэнцефалического барьера и т.д. [5–8]. Сравнительный анализ состояния нейронов гиппокампа сусликов в разных фазах цикла оцепенение–активность, а также крыс в состоянии глубокой гипотермии дает основание предполагать, что при вхождении как в естественный гипобиоз, так и в искусственную гипотермию начинают функционировать сходные механизмы, одним из компонентов которых является генерализованное снижение активности белоксинтезирующей системы с последующим ее восстановлением при выходе из низкотемпературного состояния [9].

Целью данной работы являлась оценка возможности гипотермии минимизировать степень повреждения и повышать способность нейронов головного мозга к восстановлению после воздействия ионизирующей радиации на примере анализа состояния компонентов белоксинтезирующей системы нейронов головного мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали крыс – самцов линии Wistar массой 200 – 250 г.

Сочетание гипоксии-гиперкапнии с пониженной температурой среды является естественным фактором, облегчающим некоторым видам

Сокращение: ЧС – частота сердцебиений, АО – акридин-оранжевый, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, АГ – аппарат Гольджи.

гибернаторов вход в спячку, а также позволяет значительно и быстро охладить тело даже у теплокровного животного [10–12]. Для этого животных выдерживали 3,5 – 4 ч в закрытом сосуде объемом 5,7 л при температуре среды 2 – 4°C, что в условиях нарастающей в процессе дыхания гипоксии–гиперкапнии охлаждало крыс до 16 – 18°C с сохранением способности самостоятельно выходить из гипотермии в нормальной газовой среде. Состояние крыс сразу после извлечения из закрытого сосуда перед облучением оценивали по температуре (T) и частоте сердцебиений (ЧС). Температуру измеряли ректально датчиком электротермометра ТЭМП–60 (точность 0,2°C), помещаемого в ободочную кишку на глубину 6 см; ЧС регистрировали с помощью электроэнцефалографа ЭЭГП4–02, отводящие игольчатые электроды располагали подкожно на левой передней лапе и над лопаткой животных.

Острое облучение проводили с помощью источника γ -облучения (^{60}Co) с мощностью дозы 1,7 Гр/мин в течение 4 мин 40 с – всего 8 Гр, в комнате 5 × 5 × 5 м, экранированной метровым слоем бетона. При этой дозе наблюдается почти 100-процентная выживаемость крыс, облученных в состоянии гипотермии (16–18°C), и 100-процентная смертность «нормотермных» животных за 30-дневный период наблюдения. Существенно также, что облучение дозами до 15 Гр не вызывает первичных деструктивных изменений в центральной нервной системе животных [2,3].

Было проведено две серии опытов: крыс облучали в состоянии нормотермии (температура тела 36 – 37°C) в первой серии и гипотермии (16 – 18°C) – во второй. Материал для исследования забирали в следующие сроки: спустя 2 ч; на вторые и четвертые сутки после облучения. Крыс декапитировали согласно принятым в ИБК РАН правилам [Регламентация работы с лабораторными животными /под ред. А.А. Кудрявцевой/. Пушино, АН СССР, 1983. 8 с.] и извлекали головной мозг.

Состояние компонентов белоксинтезирующей системы нейронов исследовали с помощью флуоресцентной и электронной микроскопии, для чего изолированные участки мозга (гиппокамп и сенсомоторная область коры) фиксировали: для микроспектрального анализа – в жидкости Карнуа с последующими обезвоживанием и заливкой в парафин; для ультраструктурного анализа – в 2,5% растворе глутаральдегида, приготовленном на 0,1 М какодилатном буферном растворе (рН 7,2 – 7,4) с последующими постфиксацией в 1% растворе четырехокиси осмия на том же буфере, обезвоживанием и заключением в эпоксидную смолу.

Парафиновые срезы (толщиной 6 мкм) после депарафинирования окрашивались флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым (АО) по методике, описанной ранее [13]. Мономеры АО образуют комплексы с двунитевыми участками РНК, которые флуоресцируют в области 530 нм, а находящиеся в растворе димеры АО связываются с однотяжевыми участками РНК и флуоресцируют в области 640 нм. Измерения проводились на микроспектрофлуориметре ДМФ–2, описанном ранее [14,15]. Для анализа состояния цитоплазмы нейронов использовали отношение интенсивностей красной и зеленой флуоресценции $K_\alpha = (I_{640})/(I_{530})$. Ранее было показано, что коэффициент K_α отражает состояние рРНК в рибосомах и коррелирует с долей рибосом, ассоциированных в полирибосомы, от общего количества рибосом, что позволяет оценить интенсивность белкового синтеза [13]. Для каждого случая исследовали от 300 до 700 клеток. Достоверность различий средних значений оценивали по t -критерию Стьюдента.

Для электронно-микроскопических исследований ультратонкие срезы окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца по стандартной методике. Прямое приборное увеличение определяли по реплике решетки (2160 линий на 1 мм). Анализировали морфологию таких компонентов клетки, как ядрышко, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), аппарат Гольджи (АГ), полирибосомы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение интенсивности белкового синтеза в нейронах гиппокампа (поля СА1 и СА3) и сенсомоторной коры крыс, облученных в состояниях нормотермии и гипотермии, оценивали по изменению величины K_α через 2 ч, на вторые и четвертые сутки. У контрольных крыс на вторые сутки после облучения наблюдалось максимальное снижение значений K_α во всех исследуемых структурах (рис. 1), причем наиболее выражено оно было в нейронах поля СА1 гиппокампа, что указывает на большую чувствительность этой структуры к облучению (как и к другим повреждающим факторам [16]. Однако на четвертые сутки в нейронах именно этой области было отмечено наиболее быстрое восстановление белоксинтезирующей активности. Наименьшие изменения значений K_α наблюдали в нейронах неокортекса.

При анализе влияния радиации на крыс, облученных в состоянии гипотермии, следует учитывать, что эти воздействия и сами по себе могут вызвать значительные изменения в клетках, в частности, в состоянии белоксинтезирующей системы (рис. 2). Гипотермия вызывает

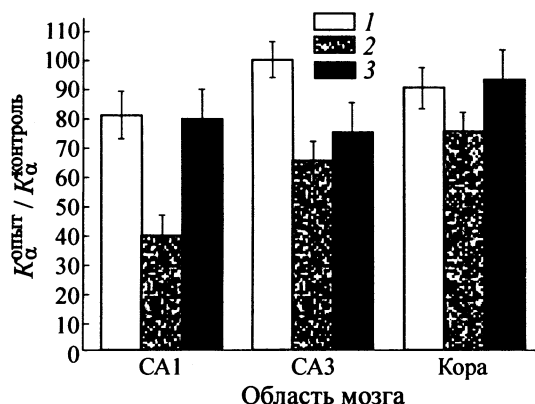


Рис. 1. Гистограмма значений относительной величины $K_{\alpha}^{\text{опыт}}/K_{\alpha}^{\text{контроль}}$ нейронов полей CA1 и CA3 гиппокампа и пятого слоя сенсомоторной коры крыс, облученных в состоянии нормотермии дозой 8 Гр (мощность дозы 1,7 Гр/мин): 1 – через 2 ч; 2, 3 – на вторые и четвертые сутки соответственно.

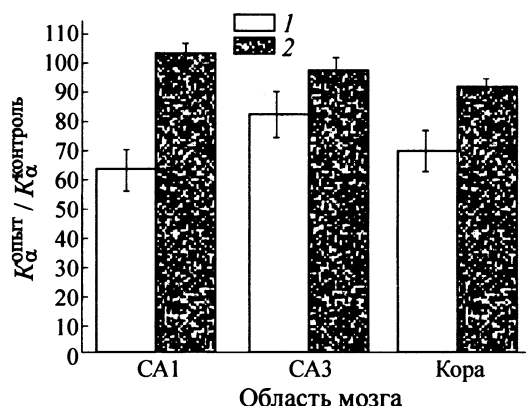


Рис. 2. Гистограмма значений относительной величины $K_{\alpha}^{\text{опыт}}/K_{\alpha}^{\text{контроль}}$ нейронов полей CA1 и CA3 гиппокампа и пятого слоя сенсомоторной коры крыс, подвергнутых охлаждению в условиях гипоксии – гиперкапнии (до T 16 – 18°C) (1) и на вторые сутки после выхода из гипотермии в нормальной газовой среде (T 36 – 37°C) (2).

большее снижение K_{α} во всех исследуемых структурах в первые часы после воздействия, по сравнению с облучением (рис. 3), и, следовательно, наибольший вклад в снижение K_{α} вносит через 2 ч после облучения охлажденных крыс. Уже на вторые сутки после облучения значения K_{α} для нейронов коры и поля CA3 гиппокампа практически не отличаются от контроля, в чем, возможно, проявляется защитная роль гипотермии. Снижение величины этого коэффициента для клеток поля CA1 не так выражено, как это наблюдается у крыс, облученных при комнатной температуре. При сравнении рис. 1 и 3 можно видеть, что в нервных клетках животных, облученных в состоянии гипотермии, белоксинтезирующая активность восстанавливается быстрее. По нашим показателям восстановление активности синтеза белка в нейронах крыс, облученных при гипотермии, наблюдается к 4-м суткам, в то время как в случае облучения животных при нормальной температуре нормализация ультраструктур отмечена лишь к 11-м суткам [2], что согласуется с данными о восстановлении белоксинтезирующей активности в нейронах сусликов, облученных в состоянии нормотермии [1].

Радиация неодинаково влияет на разные участки мембран ЭПР и АГ. Отдельные фрагменты ЭПР сохраняют свою структуру, однако наблюдаются и случаи трансформации мембран. Часть мембран теряет рибосомы и образует пластинчатые, плотноупакованные элементы – мультламеллярные тела (рис. 4). Характерно, что такие структуры наблюдаются и в нейронах крыс, подвергнутых гипотермии. Кроме того, на электронных микрофотографиях появляются проекции мембран ЭПР с «размытыми очертаниями», причем ко 2-м суткам их

количество увеличивается. Такая «размытость» характерна и для мембран АГ, часть которого распадается на отдельные везикулы; в цитоплазме значительно увеличивается количество везикул. У крыс, облученных при нормальной температуре, такие изменения более выражены, наблюдается большее количество мультивезикулярных телец. Нечеткость очертаний мембран может быть объяснена различными способами. Во-первых, такой их вид может быть связан с потерей формы трубочек ретикулума, вызванной снижением жесткости связанного цитоскелета; в результате этого трубочки уплощаются, а вероятность прохождения среза в плоскости, тангенциальной к ее поверхности, повышается.

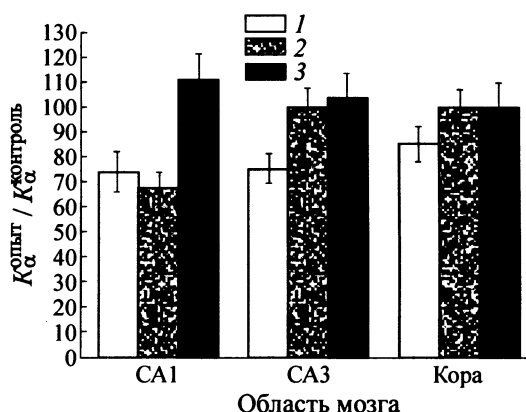


Рис. 3. Гистограмма значений относительной величины $K_{\alpha}^{\text{опыт}}/K_{\alpha}^{\text{контроль}}$ нейронов полей CA1 и CA3 гиппокампа и пятого слоя сенсомоторной коры крыс, облученных в состоянии гипотермии дозой 8 Гр, 1 – через 2 ч; 2, 3 – на вторые и четвертые сутки соответственно.

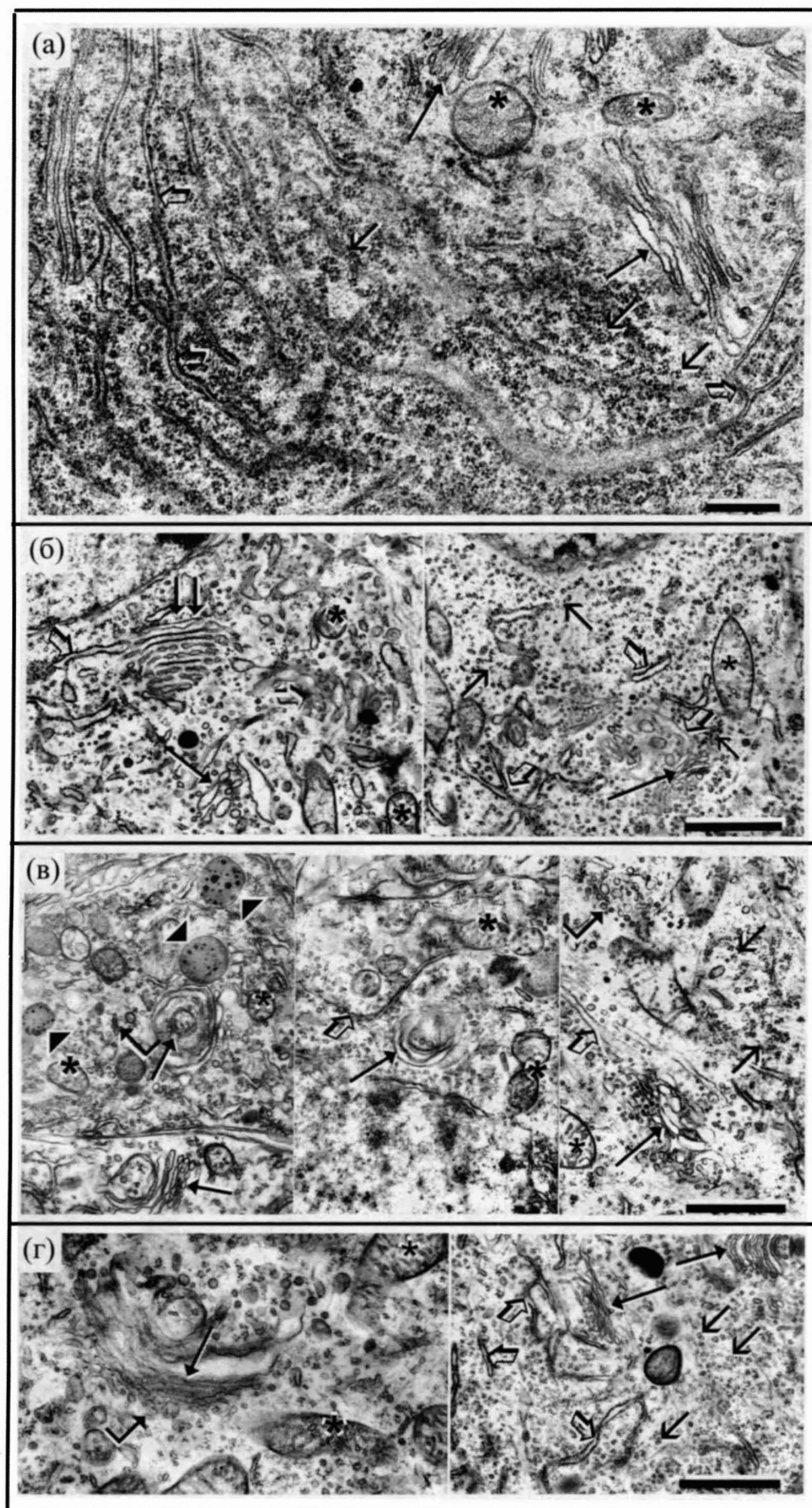


Рис. 4. Ультраструктура цитоплазмы нейронов гиппокампа крыс в контроле (а), на вторые сутки после облучения дозой 8 Гр в условиях гипотермии (б) и нормотермии (в), на четвертые сутки после облучения при нормотермии (г). Обозначения: * – митохондрии; ↗ – эндоплазматический ретикулум; ↖ – аппарат Гольджи; ← – полирибосомы; $\blacktriangleleft$ – мультивезикулярные тельца; ≡ – мультиламеллярные тела, ↵ – везикулы. Шкала соответствует 1 мкм.

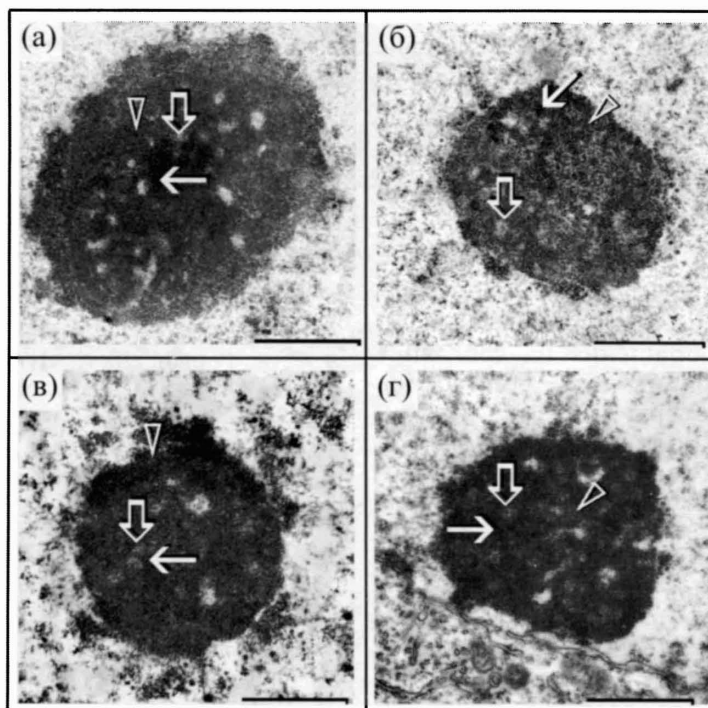


Рис. 5. Ультраструктура ядрышка нейронов гиппокампа крыс в контроле (а), через 2 часа после облучения в состоянии нормотермии (б), на четвертые сутки после облучения в условиях нормотермии (в) и гипотермии (г). Обозначения: ⇨ – фибриллярный центр; → – фибриллярный компонент; ▷ – гранулярный компонент. Шкала соответствует 1 мкм.

Но вероятность такого объяснения невысока, так как на поперечных срезах трубочек такие искажения не обнаруживаются. Во-вторых, такая размытость проекций мембран может объясняться реальным разжижением и разбуханием мембран, связанным с изменением их состава. И в-третьих, это же изменение состава может влиять на взаимодействие компонентов мембран с фиксаторами и контрастерами, что может опосредовано сказаться и на их проекциях, видимых в электронном микроскопе.

Так как в нейронах крыс, облученных при гипотермии, к 4-м суткам наблюдается восстановление величины K_{α} , что подтверждается увеличением количества полирибосом, то мембранные структуры ЭПР и АГ к этому моменту еще не восстанавливают свою целостность и, вероятно, прежний липидный состав (рис. 4). По-видимому, облучение в большей степени действует именно на мембраносодержащие структуры. Известно, что мембраны являются одной из основных мишеней при облучении клетки и при этом меняют свои биофизические характеристики. Липидные компоненты мембраны становятся более текучими, стык липидов и белков в липопротеидной мембране становится более жестким [17]. Причиной такого повреждения клеточных мембран считают ин-

дуцированный облучением оксидативный стресс [17,18].

Облучение вызывает изменения в биогенезе рРНК, что отражает ультраструктура ядрышка нейронов (рис. 5). У крыс, облученных в состояниях как гипотермии, так и нормотермии, в первые часы после облучения наблюдается выброс рибосомальных субъединиц из ядра в цитоплазму. Однако у животных, облученных при нормотермии, наблюдается в дальнейшем торможение процессинга, а возможно, и транскрипции, что выражается наличием в ядрышке фибриллярного компонента при практически полном отсутствии гранулярного, в то время как у крыс, облученных при гипотермии, восстановление биогенеза рРНК идет с большей скоростью, на что указывает накопление гранулярного компонента в ядрышке. Различия в состоянии ядрышка нервных клеток крыс, облученных в состоянии нормотермии и гипотермии, можно объяснить такими нарушениями в организации хроматина нейронов головного мозга, которые затрагивают в основном транскрипционно активные участки гена [19,20], а также вызывают торможение процессинга за счет деградации 18S рибосомальной РНК [21].

Известно, что белки ядерного матрикса играют значительную роль в процессах транскрипции и процессинга [22]. Согласно литера-

турным данным, радиочувствительность кросс-линкерных связей на надмолекулярном уровне очень высока [23,24]. Глубокая гипотермия животных в момент облучения может существенно снизить степень повреждения комплекса ДНК–матрикс [23], в результате чего нейроны сохраняют способность к восстановлению транскрипции и процессинга.

Кроме прямого воздействия радиации необходимо учитывать и возможность опосредованных, вторичных эффектов, например, влияние нарушения кровообращения на состояние нейронов, что может приводить к развитию ишемии. Некоторые авторы считают, что гибель нейронов после облучения наступает в результате гипоксии, обусловленной нарушением процессов клеточного метаболизма [2], что в свою очередь является причиной оксидативного стресса. Другими исследователями показано, что именно гипоксия значительно снижает степень повреждения клеток, вызванных радиацией [25,26]. Предполагается, что гипоксия подавляет оксирадикальную продукцию, вызванную облучением, которая является причиной повреждения хроматина, мембран и других клеточных структур. В наших опытах охлаждение крыс до 16 – 18°C в шесть-семь раз снижало ЧС (50 – 70 уд/мин по сравнению с 340 – 360 уд/мин в нормотермии); сходным образом снижается и прямо сопряженная с ЧС скорость потребления O_2 , а следовательно, и уровень метаболизма, что оказывало положительное влияние на сохранность клеточных структур и процессов метаболизма при облучении.

Отметим сходство результатов, полученных на сусликах через сутки после их облучения при входе в спячку, и на крысах, облученных в глубокой гипотермии. У сусликов в условиях естественного гипобиоза в десятки раз подавлена активность всех функциональных систем организма [27–29], что существенно понижает порог восприятия любого повреждения. У крыс в состоянии искусственного гипобиоза – глубокой гипотермии, – возможно, действуют сходные ингибирующие механизмы, понижающие радиочувствительность животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Р. Я. Гордон, Д. А. Игнатьев, Е. В. Мельникова и др., *Биофизика* **51** (2), 316 (2006).
2. А. А. Манина, *Лучевые поражения и восстановительные процессы в центральной нервной системе* (Медицина, Л., 1964) 199 с.
3. А. Е. Иванов, Н. Н. Куршакова и В. В. Шиходыров, *Патологическая анатомия лучевой болезни* (Медицина, М., 1981) 303 с.
4. Д. А. Игнатьев, Р. Я. Гордон, В. В. Воробьев и В. В. Рогачевский, *Биофизика* **50** (1), 140.
5. S. Fischer, et al, *Mol. Brain Res.* **74**, 135 (1999).
6. Z. Zhang, R. A. Sobel, D. Cheng, et al., *Mol. Brain Res.* **95**, 75 (2001).
7. K. L. Drew, M. E. Rice, T. B. Kuhn and M. A. Smith, *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 563 (2001).
8. K. B. Storey and J. M. Storey, *Biol. Rev.* **79**, 207 (2004).
9. Р. Я. Гордон, Д. А. Игнатьев, В. В. Рогачевский и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **42** (3), 237 (2006).
10. Д. А. Игнатьев, Г. С. Сухова и В. П. Сухов, *Журн. общ. биологии* **62**, 66 (2001).
11. J. Giaja, *Biol. Med.* **42**, 545 (1953).
12. М. Н. Тимофеев, *Искусственный гипобиоз* (М., 1983).
13. R. Ya. Gordon, L. S. Bocharova, I. I. Kruman, et al., *Cytometry* **29**, 215 (1997).
14. В. Н. Карнаухов, В. А. Яшин, А. Р. Казанцев и др., *Цитология* **29**, 113 (1987).
15. В. Н. Карнаухов, *Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды* (Наука, М., 2001) 186 с.
16. M. P. Matson and S. B. Kater, *Brain Res.* **490**, 110 (1989).
17. M. Benderitter, L. Vincent-Genod, J. P. Pouget and P. Voisin, *Radiat. Res.* **159**, 471 (2003).
18. Ph. Tofilon and J. R. Fike, *Radiat. Res.* **153**, 357 (2000).
19. А. Ф. Протас, *Радиационная биология и радиационная экология* **37**, 320 (1997).
20. S-M. Chin, N. L. Oleinick, L. R. Friedman, and P. J. Stambrook, *Biochim. Biophys. Acta* **699**, 15 (1982).
21. J. M. Klorak, D. McClain, S. L. Snyder, et al., *Radiat. Res.* **118**, 330 (1989).
22. И. Б. Збарский и С. Н. Кузьмина, *Скелетные структуры клеточного ядра* (Наука, М., 1991) 246 с.
23. K. Elmroch, L. J. Erkel and R. Hultborn, *Radiat. Res.* **152**, 137 (1999).
24. Р. Я. Гордон, Е. Г. Новоселова, Н. Л. Круглова и др., *Биофизика* **46** (4), 676 (2001).
25. K. Roy, S. Kodama, K. Susuki, et al., *Radiat. Res.* **154**, 659 (2000).
26. J. K. Chen, L. J. Hu, J. Wong, et al., *Radiat. Res.* **163**, 644 (2005).
27. K. U. Frerichs, C. B. Smith, M. Brenner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14511 (1998).
28. Д. А. Игнатьев, Г. С. Сухова и В. П. Сухов, *Журн. общ. биологии* **62**, 66 (2001).
29. Д. А. Игнатьев, В. И. Загнойко, Г. С. Сухова и др., *Журн. общей биологии* **56**, 450 (1995).

Protective Effect of Hypothermia on Brain Neurons of Rats Exposed to Ionizing Radiation

R.Ya. Gordon, D.A. Ignatyev, E.V. Mel'nikova, V.V. Rogachevsky, I.V. Kraev,
and S.S. Khutzian

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The conditions of the protein-synthesizing system in neurons of the hippocampus (areas CA1 and CA3) and of the cortex (sensomotor region) in rats subjected to γ -irradiation at a dose of 8 Gy under hypothermia (16 – 18°C) and hypoxia-hypercapnia were investigated by fluorescent and electron microscopy. Under hypothermia, the protein-synthesizing system was shown to be damaged to a lesser degree and to be restored faster in comparison with similar neurons in rats irradiated at room temperature. In rats irradiated under hypothermia, the rRNA biogenesis and the protein-synthesizing activity of polyribosomes were restored in two days. The protective influence of hypothermia did not spread to changes in membrane structures (endoplasmic reticulum and Golgi apparatus); i.e., a partial loss of integrity and possible transformation of their structure caused by the irradiation and the restoration of these structures occurred at a lower rate.

Key words: hypothermia, hypoxia, hypercapnia, ionizing radiation, neurons, protein synthesizing system