

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛАЗЕРНОГО ПОДАВЛЕНИЯ РАДИАЦИОННЫХ ПОРАЖЕНИЙ МЫШЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНТЕРВАЛА ВРЕМЕНИ МЕЖДУ ОБЛУЧЕНИЯМИ

К.Ш. Восканян¹, С.В. Ворожцова², А.Н. Абросимова², Г.В. Мицын¹, В.Н. Гаевский¹

¹ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

² Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Исследовали модифицирующее действие лазерного излучения с длиной волны 650 нм на выживаемость, параметры периферической крови, количество кариоцитов и митотический индекс клеток костного мозга аутбредных мышей CD1, подвергнутых облучению γ -квантами ^{60}Co в дозах 5 Гр или 7 Гр. Воздействие лазерным излучением осуществляли через 2 или 24 ч после воздействия γ -облучения. Результаты экспериментов показали, что снижение радиационного поражения мышей с помощью лазерного излучения с плотностью энергии 1 мДж/см² возможно через 24 ч после воздействия ионизирующего излучения в дозе 5 Гр, приводящей к костномозговой форме ОЛБ. При летальной дозе ионизирующего излучения 7 Гр, приводящей к переходной форме ОЛБ, увеличение продолжительности жизни мышей наблюдаются при использовании лазерного излучения как через 2, так и через 24 ч после воздействия ионизирующего излучения, однако использование лазера через 2 ч после поражения ионизирующим излучением существенно эффективнее.

Ключевые слова: гамма-излучение, радиационно-индуцированные поражения, лазерное излучение, противорадиационные эффекты, мыши

Ранее нами было исследовано действие γ -излучение ^{60}Co (3 Гр) и последующего воздействия лазерного излучения с длиной волны 650 нм на параметры периферической крови и количество кариоцитов костного мозга экспериментальных мышей линии С57ВЛ/6. Оказалось, что лазерное излучение способно улучшить восстановление кроветворения мышей после воздействия ионизирующего излучения. Были также получены данные, свидетельствующие о том, что лазерное облучение способствует повышению выживаемости мышей, предотвращает повреждение кожного покрова, повышает митотический индекс клеток костного мозга после воздействия на них γ -излучения (5 Гр) [1]. В указанных экспериментах воздействие лазером проводили в течение 30 мин после ионизирующего воздействия. С практической точки зрения

важно определить тот промежуток времени, в течение которого лазерное облучение способно в максимально возможной степени снизить радиационное поражение мышей. Цель исследования состояла в изучении модифицирующего эффекта лазерного излучения, использованного через 2 или 24 ч, на течение и исход радиационного поражения в дозах 5 или 7 Гр.

Методика

Опыты были проведены на аутбредных мышцах (самцах и самках) CD1 массой 21–26 г в соответствии с биоэтическими правилами проведения исследований на животных [2].

Животные получали стандартный брикетированный корм и питьевую воду из поилок. Перед забоем мышей взвешивали, из хвоста

животных брали кровь для подсчета количества лейкоцитов периферической крови, а также для определения содержания гемоглобина в крови, затем забивали методом цервикальной дислокации. Для анализа количества кариоцитов очищенную от мышц бедренную кость животного помещали в химический стаканчик емкостью 50 мл и измельчали в 6 мл 3 %-го раствора уксусной кислоты.

Для определения митотического индекса из очищенной бедренной кости с помощью шприца извлекали костный мозг, который суспензировали в гипотоническом растворе цитрата натрия с последующим приготовлением мазков на предметных стеклах. Мазок костного мозга фиксировали в абсолютном метиловом спирте, а затем окрашивали по методу Романовского-Гимзы [3].

Содержание гемоглобина в крови определяли с помощью гемоглобинометра Мини-Гем 540 (ЗАО НПП Техномедика, Москва). Количество лейкоцитов крови и кариоцитов подсчитывали с помощью камеры Горяева по общепринятой методике [3].

Облучение

Облучение мышей проводили в медико-техническом комплексе Лаборатории ядерных проблем Объединенного института ядерных исследований [4].

Облучение мышей γ -лучами проводили на γ -терапевтическом аппарате "Рокус-М" фирмы "Равенство" с источником ^{60}Co . Измерения мощности дозы γ -источника проводили дозиметром PTW UNIDOS-E (фирмы PTW-Freiburg, Германия) с ионизационной камерой TM30013-03378, мощность дозы 1 Гр/мин. В качестве ис-

точника лазерного излучения использовали созданное нами устройство для радиационной защиты биологических объектов в эксперименте [5]. Длина волны лазерного излучения 650 нм. Диаметр лазерного пучка в точке облучения составлял 2,6 см.

Мышей подвергали тотальному воздействию γ -излучения в дозах 5 Гр или 7 Гр, затем через 2 ч или 24 ч облучали лазером. Лазерным излучением (плотность энергии 1 мДж/см²) облучали область спины. Площадь расширенного пучка в точке облучения составляла $\approx 5,3 \text{ см}^2$ (примерно 1/3 поверхности спины).

Для обработки полученных данных использовали пакет общепринятых методов статистической обработки, вложенных в компьютерную программу Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены значения параметров периферической крови и кариоцитов костного мозга интактных мышей (самки), а также значения тех же параметров мышей, подвергшихся облучению γ -квантами 5 Гр или комбинированному облучению γ -квантами и лазером (в разные сроки после воздействия ионизирующим излучением) через 15 сут после облучения. Результаты показывают, что параметры крови только после гамма-облучения достоверно не отличаются от результатов комбинированных облучений. Однако количество кариоцитов при облучении мышей лазером через 24 ч после гамма-облучения достоверно выше чем при облучении лазером через 2 ч.

В табл. 2 приведено количество митозов на 1 тыс. ядросодержащих костномозговых клеток этих же мышей через 15 сут после гам-

Таблица 1

Значения параметров периферической крови и кариоцитов костного мозга интактных мышей (самки), а также мышей, облученных γ -квантами в дозе 5 Гр, с последующим воздействием лазерным излучением (1 мДж/см²) через 15 сут после облучения

Количество мышей	Средний вес, г	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, 10 ³ мкл	Кариоциты, 10 ³ мкл
Интактные мыши				
6	22,85 ± 3,2	135 ± 27	3,2 ± 0,3	75,1 ± 5,9
Облучение гамма-квантами в дозе 5 Гр				
6	22 ± 2,8	123 ± 29,6	2,11 ± 0,27	28,5 ± 2,8**
Воздействие лазера через 2 ч после гамма-облучения в дозе 5 Гр				
6	24 ± 3,7	117,8 ± 30,6	2,24 ± 0,5	21,1 ± 3,3**
Воздействие лазера через 24 ч после гамма-облучения в дозе 5 Гр				
6	21,6 ± 2,07	122,4 ± 18,7	1,96 ± 0,3	39 ± 7,4* **

Примечание. * – значение достоверно выше значения количества кариоцитов при облучении лазером через 2 ч; ** – значения достоверно ниже значения количества кариоцитов необлученных мышей

Таблица 2

Число митозов на 1 тыс. ядросодержащих костномозговых клеток мышей (самки) через 15 сут после гамма-облучения в дозе 5 Гр с последующим воздействием лазерным излучением (1 мДж/см²)

Необлученный контроль	γ-излучение	γ-излучение + лазер (через 2 ч)	γ-излучение + лазер (через 24 ч)
18 ± 5,2	6,37 ± 1,6 **	6 ± 0,2 **	20,6 ± 6,9 *

Примечание. * – значение достоверно выше значения при облучении только γ-лучами; ** – значение достоверно ниже значения необлученного контроля

ма-облучения, а также гамма-облученных и последующим лазерным излучением через 2 ч и 24 ч после облучения γ-квантами. Нетрудно заметить, что митотический индекс клеток костного мозга при облучении лазером через 24 ч после облучения ионизирующим излучением находится на уровне контроля.

Полученные результаты дают основание заключить, что использование лазера для стимулирования пострadiационного восстановления кроветворения через 24 ч после радиационного поражения вполне эффективно.

Поскольку в этих экспериментах была использована доза ионизирующего излучения, приводящая к костномозговой форме острой лучевой болезни (ОЛБ) у мышей, то возможно, что неэффективность облучения лазером через 2 ч после воздействия ионизирующего излучения связана с закономерностями клеточного опустошения – наиболее важного проявления поражения кроветворных органов [6]. Известно, что дозы в 2–10 Гр вызывают гибель клеток костного мозга непосредственно в момент облучения или в митозах, при этом клетки теряют способность к делению. Гипоплазия и аплазия костного мозга наблюдается в течение первых суток после облучения, что связано с массовой гибелью клеток [7]. Установлено, что пострadiационное восстановление гемопоэтических клеток костного мозга определяется процессами пролиферации и дифференцировки малоповрежденных или неповрежденных стволовых клеток. Вероятно, лазерное излучение, использованное через 24 ч, стимулирует эти процессы.

На рис. 1 представлена динамика гибели мышей после гамма-облучения в дозе 7 Гр, а также после облучения γ-квантами и последующего воздействия лазерного излучения (1 мДж/см²). Результаты исследования показывают, что лазерные облучения мышей через 2 и 24 ч после воздействия γ-излучения приводят к отсрочке начала их гибели, однако облучение лазером через 2 ч после радиационного поражения более эффек-

тивно. В этом эксперименте была использована летальная доза ионизирующего излучения (7 Гр), приводящая к переходной форме ОЛБ, для которой характерно выраженное поражение кишечника и кроветворных органов. Дозу 7 Гр считают минимальной дозой, приводящей к смертельному исходу в 100 % случаев, при этом клеточное опустошение кишечника – основная причина гибели организма в течение второй недели после облучения [8]. Приведенная на рис. 1 динамика гибели мышей после гамма-облучения в дозе 7 Гр полностью соответствует вышесказанному. Результаты наших экспериментов, приведенные в табл. 1, показывают, что митотический индекс клеток костного мозга при облучении лазером через 24 ч после ионизирующего облучения находится на уровне контроля.



Рис. 1. Динамика гибели мышей (самцы) после гамма-облучения в дозе 7 Гр, а также после гамма-облучения и последующего воздействия лазерного излучения (1 мДж/см²): 1 – доза 7 Гр; 2 – доза 7 Гр + лазерное излучение (1 мДж/см²) через 24 ч; 3 – доза 7 Гр + лазерное излучение (1 мДж/см²) через 2 ч. Выживаемость в контрольной группе мышей равнялась 100 % в течение всего срока наблюдения за ними. В контрольной и остальных группах исследования было по 10 мышей

Исходя из этого и учитывая, что в экспериментах по выживаемости мышей была использована доза ионизирующего излучения приводящая к переходной форме острой лучевой болезни, можно предположить, что при облучении мышей лазером через 24 ч после гамма-облучения увеличивается срок выживания тех мышей, у которых превалирует костномозговой синдром ОЛБ. Тогда эффективность использования лазера через 2 ч может быть результатом увеличения количества выживших мышей с поражением кишечника. Судя по результатам, приведенным на рис. 1, можно предположить, что таких мышей было больше.

Выводы

На основании результатов, приведенных выше и полученных ранее, можно заключить, что подавление радиационного поражения мышей с помощью лазерного излучения с длиной волны 650 нм (плотностью энергии 1 мДж/см²) наблюдается при использовании лазера в течение 30 мин после воздействия острого и пролонгированного ионизирующего облучения [1, 9] независимо от дозы облучения (в дозовом интервале до 7 Гр), а также через 24 ч после воздействия ионизирующего излучения в дозе 5 Гр, приводящей к костномозговой форме ОЛБ. При летальной дозе ионизирующего излучения 7 Гр, приводящей к переходной форме ОЛБ, увеличение продолжительности жизни мышей наблюдаются при использовании лазерного излучения как через 2, так и через 24 ч после воздействия ионизирующего излучения, однако эффективность лазера при использовании через 2 ч после поражения ионизирующим излучением существенно выше.

Список литературы

1. Voskanyan K., Vorozhtsova S., Abrosimova A. et al. Laser device for the protection of biological objects from the damaging action of ionizing radiation. // J. of Phys. Sci. Appl., 2012, No. 6, P. 152–157.
2. Генин А.М., Ильин Е.А., Капланский А.С. и соавт. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине. // Авиакосм. и экол. мед., 2001, **35**, № 4, С. 14–20.
3. Коблов Л.Ф. Методы и приборы для клинических и лабораторных исследований. – М., 1979.
4. Savchenko O.V. Status and prospects of new clinical methods of cancer diagnostics and treatment based on particle and ion beams available at JINR. // Commun. Joint Inst. Nucl. Res., Dubna, 1996, E18-96-124.
5. Voskanyan K., Vorozhtsova S., Abrosimova A. et al. Laser device for the protection of biological objects from the damaging action of ionizing radiation. // Proc. 2nd Internat. Conf. Nanotechnologies and Biomed. Eng., Chisinau, Republic of Moldova, April 18–20, 2013, P. 519–521.
6. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Основы радиационной биофизики. – М., 1982.
7. Александров Ю.А. Основы радиационной экологии: Учебное пособие. – Йошкар-Ола, 2007.
8. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. – М., 1988.
9. Voskanyan K., Vorozhtsova S., Abrosimova A. et al. Reduction of radiation damage in mice after acute and prolonged irradiation with gamma rays by means of laser device. // J. of Phys. Sci. Appl., 2014, No. 4, P. 501–550.

THE EFFECTIVENESS OF RADIATION DAMAGE REDUCTION IN MICE BY LASER LIGHT IN DEPENDENCE OF THE TIME INTERVAL BETWEEN EXPOSURES

K. Voskanyan¹, S. Vorozhtsova², A. Abrosimova², G. Mitsyn¹, V. Gaevskiy¹
¹ Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

² Institute of Medico-Biological Problems of the RAS, Moscow, Russia

Research was carried out to determine the period of time during which it is possible to reduce the radiation damage in mice by means of laser radiation (650 nm) after gamma irradiation. First the mice were exposed to γ -radiation (whole body irradiation), then after 2 hours or 24 hours they were irradiated with 635 nm laser radiation (1 mJ/cm²). The results of these studies have shown that the use of laser irradiation to reduce radiation damage in mice is effective 24 hours after exposure to ionizing radiation at a dose of 5 Gy which leads to the bone-marrow clinical form of the acute radiation sickness (ARS). In the case of the lethal dose of ionizing radiation 7 Gy (the transitional clinical form of the ARS) the increase in life expectancy of mice is observed using laser radiation both 2 and 24 hours after exposure to γ -radiation, but the effectiveness of the laser by using 2 hours after the ionizing radiation is significantly more efficient.

Key words: gamma-radiation, radiation-induced damages, laser irradiation, supression of radiation effects, mice

E-mail: voskan@jinr.ru