

УДК: 616-092.18

Оценка радиационно-индуцированного апоптоза в клетках костного мозга и сдвигов в составе плазмы крови мышей после экспозиции на субмагнитосферной орбите (биоспутник БИОН-М №1)

Медведева Ю.С., Яковенко Е.Н., Алчинова И.Б.

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Балтийская 8

В работе представлены результаты исследования материала, полученного после экспозиции на субмагнитосферной орбите (биоспутник БИОН-М №1) мышей линии C57BL/6N. Космический аппарат находился на околокруговой орбите (средняя высота 575 км, наклонение 64,9°) в течение 30 суток. За весь полет средняя суммарная поглощенная доза составила около 50 мГр. Плазму крови мышей полетной группы исследовали методом лазерной корреляционной спектроскопии. Клетки костного мозга (ККМ) мышей использовали для постановки схемы радиоадаптивного ответа. Дополнительная радиационная нагрузка в 0,05 и 0,5 Гр ККМ мышей вызвала снижение доли клеток с апоптозом в полетной группе. Хроническое воздействие факторов космического полета (вибрация, облучение и невесомость в течение месяца) вызвало развитие радиоадаптивного ответа, который отсутствовал в контрольной группе мышей. На уровне плазменного гомеостаза показано увеличение вклада частиц 122,9–400,0 нм, что, вероятно, является следствием деструкции наиболее чувствительных к мутагенному воздействию клеток. Изменения плазменного гомеостаза в условиях космического полета имеют обратимый характер.

Ключевые слова: БИОН-М №1, лазерная корреляционная спектроскопия, радиоадаптивный ответ, факторы космического полета

Для корреспонденции: Алчинова Ирина Борисовна, e-mail: alchinovairina@yandex.ru

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Поступила 30.04.2016

Evaluation of radiation-induced apoptosis in bone marrow cells and changes in composition of the blood plasma of mice after exposure to submagnetosphere orbit (biosatellite BION-M №1)

Medvedeva Yu.S., Yakovenko E.N., Alchinova I.B.

FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., 125315 Moscow, Russian Federation

The paper presents the results of a study of the material obtained after exposure to submagnetosphere orbit (biosatellite BION-M №1) mice of C57BL/6N strain. The spacecraft was in a near-circular orbit (average altitude of 575 km, inclination 64.9°) for 30 days. Total average absorbed dose for the entire flight was about 50 mGy. The blood plasma of mice of the flight group was investigated by the method of laser correlation spectroscopy (LCS). Bone marrow cells (BMC) were used for setting the scheme of radioadaptive response. The additional radiation load of 0.05 and 0.5 Gy caused a decline in the proportion of cells with apoptosis in the flight group. Chronic effects of space flight factors (vibration, radiation and weightlessness in a month) caused the development of radioadaptive response that was absent in the control group of mice. On the level of plasma homeostasis it was shown the increasing contribution of particles of 122.9–400.0 nm, which is probably a consequence of the destruction of the cells that were most sensitive to the mutagenic effects. Changes of plasma homeostasis during space flight are reversible.

Key words: BION-M №1, laser correlation spectroscopy, radioadaptive response, space flight factors

For correspondence: Алчинова Ирина Борисовна, alchinovairina@yandex.ru

Received 30.04.2016

Введение

По мере развития космической отрасли, увеличивалось число и продолжительность полетов, появлялись и расширялись биомедицинские исследования, и стало очевидно, что космический полет (КП) оказывает выраженное влияние на организм биообъекта. Физические стрессы, вызванные резкими изменениями гравитации (в основном микро-

гравитацией) и радиацией, комбинируются с психоэмоциональными стрессами, напряжением внимания, интенсивными нагрузками, а также психофизиологическими стрессами, связанными с изменением окружающей среды, гиподинамией и гипокинезией, аномалиями циркадных ритмов. Эти факторы в той или иной мере влияют на компенсаторно-приспособительные реакции организма [1].

В центре внимания космической медицины стоит изначально здоровый человек, поэтому ее главными задачами являются оценка уровня и сохранение здоровья космонавта, которое рассматривается с точки зрения способности на высоком профессиональном уровне выполнять программу полета, сохраняя при этом необходимые функциональные резервы для реадaptации к земным условиям [2].

Малые когорты людей, их генотипическое разнообразие, ограничения возможностей инвазивных процедур, влияние комплекса факторов на организм — все это затрудняет оценку индивидуальных адаптивных особенностей человека как во время полета, так и во время реадaptации.

Стандартной процедурой после возвращения космонавтов являются нагрузочные физиологические пробы, позволяющие оценить ущерб, нанесенный здоровью. Оценка мутагенного воздействия проводится ретроспективно и результаты отражают изменения генетического материала за время полета, однако она не позволяет оценить явление генетической нестабильности (возникновение мутаций, закрепившихся в генотипе). Несмотря на то, что суммарная доза облучения в годовом полете составляет около 7—12 сГр/год, сочетанное воздействие с вибрацией и ускорением при длительном пребывании человека в космосе приводит к увеличению частоты хромосомных aberrаций, изменению числа клеток крови, индукции различных мутационных событий [3]. Провести функциональные пробы, позволяющие выявить генетическую нестабильность у человека, представляется затруднительным.

В 2013 году был запущен биоспутник БИОН-М1 на борту которого находились лабораторные животные (в частности, мыши C57BL/6). Это позволило получить уникальный материал для радиобиологических исследований. Космический аппарат «БИОН-М» № 1 был выведен на околокруговую орбиту (средняя высота 575 км, наклонение 64,9°) на 30 суток [4]. За весь полет средняя суммарная поглощенная доза составила около 50 мГр [5]. После возвращения биоспутника наша лаборатория получила клетки костного мозга (ККМ) и плазму крови мышей для дальнейших исследований в рамках космического эксперимента «Резистентность».

Работа с ККМ мышей позволила нам использовать явление радиоадаптивного ответа (РАО) как нагрузочный тест для оценки репаративных возможностей клеток. РАО заключается в снижении уровня цитогенетических нарушений, повышении выживаемости клеток, понижении уровня образования опухолей, повышении устойчивости к инфекциям [6]. Адаптивный ответ считают наиболее сложной из защитных реакций организма, развивающихся как на клеточном уровне, так и на уровне организма. Иницирующая стадия этой реакции вызывается адаптирующими, малыми дозами, что влечет за собой активацию генома клетки и дальнейшее появление новых генных продуктов, которые обуславливают резистентность клетки к последующему облучению в больших дозах. Воздействие окислительного стресса после облучения радиацией в малых дозах также индуцирует активацию защитных механизмов [7]. Проявление радиоадаптивного ответа (РАО) напрямую зависит от генетических особенностей биообъекта и его индукция прямо зависит от индивидуальной чувствительности организма к облучению. К механизмам индукции РАО относят комплекс процессов, относящийся к внутриклеточным изменениям, таких как: активация экспрессии определенных генов, стимуляция процессов репарации, синтез защитных

белков, ферментов репарации, стимуляция систем детоксикации свободных радикалов, апоптотическая гибель радиочувствительных клеток и клеток с неотрепарированными повреждениями ДНК, задержка клеточного цикла в ответ на вызванные генетические повреждения, активация иммунного ответа [8]. Как показывают исследования, при индукции РАО происходит активация более медленной и качественной репарации повреждений ДНК по пути гомологичной рекомбинации, а также активация процессов, предотвращающих образование радиоиндуцированных двунивых разрывов ДНК, что приводит к уменьшению частоты мутаций и выхода хромосомных aberrаций [9]. За счет этого уменьшается и элиминация клеток апоптозом.

В процессе адаптации организма к изменениям окружающей среды, к которым относят факторы космического полета (КП), происходит модификация системы гомеостаза, направление которой зависит от природы соответствующего действующего фактора. Известно, что в интегральных системах организма, к которым относится и система сывороточного гомеостаза, сдвиги, формирующиеся при развитии патологического процесса, отличаются выраженным индивидуальным полиморфизмом. Определение субфракционного состава нативных биологических жидкостей дает точное представление о соотношении в них биосубстратов, позволяя получить интегральные показатели, которые отражают динамическое состояние изучаемой системы, дает возможность индивидуально оценить тяжесть патологического процесса, а также прогнозировать характер течения заболевания.

Целью работы была оценка радиационно-индуцированного апоптоза в клетках костного мозга и сдвигов в составе плазмы крови мышей после экспозиции на субмагнитосферной орбите (Биоспутник БИОН-М №1).

Методика

Космический эксперимент «Резистентность» на спутнике «БИОН-М №1» выполнен на мышах-самцах линии C57BL/6N, полученных из питомника «Пушино». Мыши были разделены на следующие группы: полетная группа (n = 5) — животные после 30-суточного КП на биоспутнике «БИОН-М №1», соответствующий синхронный виварный контроль (n = 9), полетная группа с реадaptацией в течение 7 дней к земным условиям (n = 5), и синхронный виварный контроль (n = 8) [10].

Выведение животных из эксперимента проводили методом цервикальной дислокации. Для приготовления плазмы крови образцы в пробирках с гепарином центрифугировали в течение 20 мин при 3 тыс. об./мин. После центрифугирования супернатант отбирали с помощью дозатора в чистую пробирку. Если этап исследования был отсрочен, сразу после приготовления образцов производили их консервацию путём замораживания, не допуская размораживания биологического материала до момента проведения измерения.

Для получения ККМ мышей плечевые и тазовые кости после извлечения помещались в среду RPMI-1640 (Т) до проведения посева.

Постановка схемы индуцированного радиоадаптивного ответа

Материалом для исследования послужили ККМ, взятые из костей плечевых и тазовых костей мышей. Из диафизов костей стерильно вымывали клетки костного мозга

средой RPMI-1640 (Т) с аланил-глутамином шприцом на 2 мл. Клетки выделяли в стерильные центрифужные пробирки и дезинтегрировали (Liar fuge-vortex). После получения гомогенной взвеси определяли клеточность и жизнеспособность с помощью метиленового синего. Концентрацию клеток доводили до 1×10^6 /мл полной среды. Для культивирования клеток использовали ростовую среду, представляющую собой готовую питательную среду RPMI-1640 (Т) с аланил-глутамином с добавленным антибиотиков «Пенициллин (25000 Ед)—Стрептомицин (25 000 мкг)» из расчета 1 мл на 50 мл среды. В культуральные флаконы в качестве факторов роста использовали эмбриональную телячью сыворотку в количестве 10% от объема среды. Для исследования чувствительности к облучению была поставлена схема РАО [12]. Культуральные флаконы с ККМ облучали на цезиевом облучателе «Панорама» на базе Московской ветеринарной академии и биотехнологии им. К.И. Скрябина разными дозами: группу А — адаптирующей дозой (0,05 Гр) на стадии G0 митотического цикла, группу П — повреждающей дозой 0,5 Гр, группу А + П подвергали облучению 2 раза — сначала адаптирующей дозой, а потом повреждающей в стадии G2 митотического цикла. Контрольную группу не подвергали радиационному воздействию. Облучение в адаптирующей дозе происходило в день выделения ККМ из костных тканей (рис. 1). После этого был добавлен фитогемагглютинин-П (ФГА) («ПанЭко») во флаконы до конечной концентрации 10 мкг/мл для стимуляции деления клеток. Облучение повреждающей дозой происходило через 48 часов после внесения ФГА. Клетки инкубировали в термостате при 37°C от посева до фиксации.

Фиксацию клеток проводили через 52 часа после последнего облучения. За 2 часа до фиксации был внесен 0,04% колхицин («ПанЭко») для остановки клеточного деления. Образцы центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин, затем удаляли супернатант. К осадку добавляли 10 мл гипотонического раствора КС1 (37°C) и инкубировали 15 мин при 37°C. Суспензию клеток повторно центрифугировали и удаляли супернатант. Осадок перемешивали на магнитной мешалке и добавляли по каплям фиксатор (смесь ледяной уксусной кислоты и этанола 1:3). Фиксатор меняли дважды.

Оценка апоптоза в клетках костного мозга мышей после экспозиции на субмагнитосферной орбите

В космическом эксперименте использовали ККМ мышей, в которых определяли апоптотический индекс (АИ) методом TUNEL. Этот метод основан на флуоресцентном мечении окончаний отрезков ДНК, образовавшихся в результате фрагментации, с использованием биотин-конъюгированного дезоксиурединтрифосфата (dUTP) в реакции, катализируемой экзогенной терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазой (TdT) [13].

Препараты-мазки готовили раскапыванием суспензии ККМ на влажные охлажденные предметные стекла с расстояния около 20 см. Мазок высушивали при комнатной температуре в течение нескольких часов и фиксировали фиксатором для цитологических исследований (ООО «Гем», Россия). Для TUNEL-метода использовали набор DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, USA). Фиксированные препараты-мазки промывали 70%-ным этиловым спиртом в течение 5 мин и трехкратно отмывали фосфатным буфером. Далее стекла помещали в 20%

Тритон X-100 на 45 минут. После трехкратной промывки фосфатным буфером на стекла раскапывали уравнивающий буфер и держали под пластиковыми покровными стеклами в течение 10 минут. Затем на стекла наносили смесь нуклеотидов, накрывали пластиковыми покровными стеклами и инкубировали в течение 1,5 часов при температуре 37°C. Стекла помещали в стоп-реагент SSC на 15 минут. После этого производили трехкратную отмывку фосфатным буфером. Далее образцы окрашивали красителем Hoechst 33342 и трехкратно отмывали фосфатным буфером.

Оценку апоптоза проводили с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-U. Фотографии клеток были сделаны камерой Infinity 3 в программе Infinity Analyse. Все ядра, окрашенные Hoechst, флуоресцировали при УФ-свете ($\lambda \approx 365$ нм), а апоптотические клетки флуоресцировали в зеленой области ($\lambda \approx 500-560$ нм).

Полученные при подсчете апоптотически измененных клеток результаты были выражены в виде апоптотического индекса. Апоптотический индекс (АИ) определяли как отношение общего числа TUNEL-позитивных ядер к количеству клеток, окрашенных Hoechst33342 и имеющих видимое непикиотизированное ядро: $АИ = ДНК/Ядро \times 100\%$

Далее был посчитан коэффициент АИ, где за 100% взяли значение индекса без дополнительного облучения (К). Анализ полученных показателей проводили с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0», используя стандартные методы вариационной статистики.

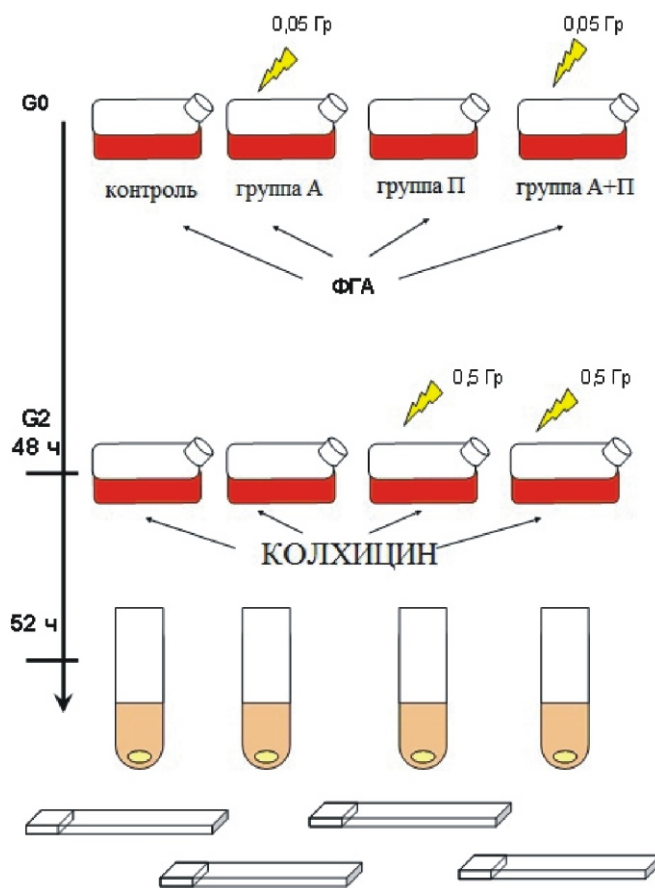


Рис. 1. Схема опыта по определению радиоадаптивного ответа клеток костного мозга мышей (пояснения в тексте).

Оценка субфракционных изменений в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии

Метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), разработанный Санкт-Петербургским институтом ядерной физики РАН совместно с ООО «Интокс» (Санкт-Петербург), предназначен для измерения спектральных характеристик монохроматического когерентного излучения в результате светорассеяния гелий-неонового лазера при прохождении через полидисперсную систему, которой являются большинство биологических жидкостей организма. Результатом исследования биологических жидкостей методом ЛКС является данные о распределении числа частиц по их размерам (субфракционный состав) или о молекулярно-массовом распределении. Для многокомпонентных образцов, каким является исследуемая нами плазма крови мышей, результатом обработки является кривая с несколькими выраженными пиками. Сравнение площадей под кривой позволяет определить изменение процентного вклада в светорассеяние частиц разного размера [11].

Образец плазмы крови непосредственно перед измерением разбавляли физиологическим раствором в соотношении 1:10, далее исследуемую биологическую жидкость в объеме 0,2 мл заливали в кювету ЛКС. Результат анализа при таком способе обработки является гистограмма, по оси ординат которой отложен процентный вклад частиц в светорассеяние, по оси абсцисс — их радиус в нм.

Результаты и обсуждение

В ходе постановки схемы РАО обнаружено достоверное снижение АИ в ККМ мышей полетной группы (таблица). В группе мышей, совершивших полет, а затем прошедших адаптацию к наземным условиям, снижение АИ произошло при дополнительном облучении ККМ повреждающей дозой 0,5 Гр. Обнаружено, что пребывание на орбите снизило процент ядер с апоптозом во всех группах с дополнительным облучением. Так как полученная животными в ходе полета доза находится в интервале, вызывающем РАО, можно предположить, что именно это воздействие стало причиной снижения апоптоза, причем после 7 дней восстановления после космического полета индукция РАО все еще сохраняется, но в меньшей степени. Следует отметить, что у животных наземных контрольных групп индукция РАО не проявлялась.

Полученные нами данные по снижению АИ в ККМ мышей после космического полета согласуются с результатами 133-суточного пребывания на орбите клеток лимфобластомы человека, где было зафиксировано снижение

уровня апоптоза и хромосомных aberrаций при послепо-летных радиационных воздействиях [14].

Доза радиации, накопленная мышами в течение полета, выступала как фактор, стимулирующий репаративные и защитные механизмы, и процессы элиминации клеток со значительными повреждениями. Адаптирующее действие дозы, вызывающее дополнительные незначительные повреждения в клетках, тем не менее, запускает механизмы апоптоза. Таким образом, происходит гибель наиболее радиочувствительных клеток популяции, в то время как оставшаяся популяция демонстрирует большую устойчивость к более интенсивному облучению. Возможно, происходит также уменьшение степени радиоиндуцируемых повреждений ДНК, что означает уменьшение индекса апоптоза при повторном облучении. В дополнение к этому есть данные показывающие, что культивируемые клетки представляют собой популяцию, асинхронную по скорости прохождения митотического цикла, а, следовательно, и по радиочувствительности, поскольку последняя меняется в ходе цикла.

Дополнительная радиационная нагрузка на клетки после возвращения мышей на Землю вызвала снижение процента клеток с апоптозом. Хроническое воздействие факторов КП (облучение и невесомость в течение месяца) вызвало развитие РАО, который отсутствовал в контрольной группе линейных мышей.

На ЛКС-гистограммах мышей после экспозиции в условиях невесомости на субмагнитосферной орбите сохраняется эффект облучения, выражающийся в увеличении количества частиц большого гидродинамического радиуса: увеличение вклада частиц размером 122,9—400,0 нм, сопровождавшееся небольшим увеличением содержания частиц мелкого размера, радиусом 8,4 нм (рис. 2). Воздействие облучения сохраняется и после 7 дней пребывания на Земле, но параметры ЛКС-гистограммы данной группы приближаются к контрольным (рис. 2), что может говорить о восстановлении плазменного гомеостаза.

Таким образом, метод ЛКС [15] дает возможность интегральной оценки глубины сдвига гомеостаза, произошедшего в организме под действием факторов космического полета (микрогравитация, ионизирующее излучение, гиподинамия и др. особенности содержания в контейнерах «БИОС-МЛЖ»).

Выводы

1. Дополнительная радиационная нагрузка на клетки после возвращения на Землю вызвала уменьшение процента клеток с апоптозом.

Таблица

Величины коэффициента апоптотического индекса в ККМ мышей при постановке схемы радиоадаптивного ответа в группах А, П и А + П

Серии опытов	А (0,05 Гр)	П (0,5 Гр)	А + П (0,05 + 0,5 Гр)
Контроль к полету	1,34	1,75	1,76
Полет	1,17*	1,31	0,98*
Контроль к полету с реадаптацией	1,47	1,44	1,12
Полет с реадаптацией	1,31	1,33	1,33*

Примечание. * — $P_U < 0,05$ с соответствующей контрольной группой

