

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ РАНЬОЇ РЕАКЦІЇ КЛІТИН НА ОПРОМІНЕННЯ

(21) 99063077

(22) 03.06.1999

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р.

(72) Зотіков Лев Олександрович, Галахін
Костянтин Олександрович, Петренко Зінаїда
Михайлівна, Барабой Вілен Абрамович(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИ-
ТУТ ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОЛОГІЇ МІНІСТЕРСТВА
ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення ступеня ранньої реакції клітин на опромінення шляхом електронно-мікроскопічного дослідження їх структури, який відрізняється тим, що визначається відношення числа мітохондрій з псевдоємлінізацією їх мембран до всієї кількості мітохондрій у профілях цитоплазми незрілих гранулоцитів кісткового мозку безпородних щурів.

Заявка відноситься до радіобіології може використовуватися в радіаційній медицині та онкології.

У літературі, яка відображає кількісні морфологічні аспекти впливу радіації на клітини та тканини, мають місце аналоги двох типів:

– ті, що реєструють деструктивні зміни клітин та їх структурних елементів – органоїдів, включень тощо [1];

– ті, що демонструють морфометричні показники змін мітохондрій як органоїду в цілому, так і його ультраструктурних елементів [2,3].

Прототипом запропонованого способу є кількісний аналіз постпроменевої появи і послідувочі динаміки мембранних дефектів з м'єліноїдною трансформацією (МТ), який проводиться методом електронної мікроскопії (Е.И. Воробьев, Р.П. Степанов Ионизирующее излучение и кровеносные сосуды // Энергоатомиздат. – М., 1985. – 296 с.).

Недоліками прототипу є:

– одиницями спостереження (меристичною ознакою) є клітини, які містять будь-яке мембранне пошкодження з м'єліноподібною трансформацією будь-якого органоїду;

– об'єктом спостереження є тільки ендотеліоцити кровеносних судин міокарда, котрі вважаються одним з найрадіорезистентніших клітинних об'єктів;

– реєстрація мембранних змін відбувається не раніше години після дії.

Задачею запропонованого винаходу є розробка способу кількісного морфологічного визначення ступеня ранньої реакції клітин кісткового мозку на опромінення шляхом електронно-мікрос-

копічного дослідження однієї з особливостей ультраструктури їх мітохондрій. Такою особливістю є утворення в середині мітохондрій м'єліноподібних осміофільних фігур, котрі оцінюються як донекротична ознака дистрофії мітохондрій. Кількість мітохондрій, які зазнають таку форму дистрофії, є вірогідним показником інтенсивності патогенної дії опромінення на кістковий мозок.

Спосіб полягає у визначенні ступеня ранньої реакції клітин на опромінення шляхом електронно-мікроскопічного дослідження ультраструктури, де згідно винаходу, визначають відношення числа мітохондрій з наявністю "псевдомієлінізації" їх мембран (ПММ) до всієї кількості мітохондрій у профілях цитоплазми незрілих гранулоцитів кісткового мозку безпородних щурів.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Після умертвіння опромінених тварин шляхом одномоментної декапітації або внутрішньовенної повітряної емболії розтинається кістковомозковий канал стегнової кістки. Кістковий мозок вилучається атраumaticно і тканина його подрібнюється лезом на шматочки діаметром не більше 1 мм³. Подрібнена тканина кісткового мозку фіксується протягом 1,5 години 1,6% розчином глутарового альдегіду в 0,1 М фосфатному буфері за Серенсом при рН – 7,3. Потім шматочки тканини промиваються протягом 20 годин в тому ж буфері і дофіксуються 2% розчином тетраоксиду осмію в тому ж буфері протягом 1,5 годин при 4°C. Потім тканина зневоднюється в спиртах зростаючої концентрації та абсолютному ацетоні і заключається в комплекс епоксидних смол "Епон". Ультратонкі зрізи з епонових блоків виготовляються на

ультрамикротомах ЛБК 8800 111 (Швеція) і контрастуються ураніл-ацетатом за Лафтом і цитратом свинцю за Рейнольдсом. Дослідження препаратів проводилося в електронному мікроскопі JEM-100B (Японія) при прискорюючій напрузі 60 кВ.

Підрахунок ознаки проводився не менше, ніж в 10 клітинах, які спостерігали в різних полях зору на зрізах тканини, котрі робили з декількох епонованих блоків, які брали від 4–5 тварин, що дозволяє створити репрезентативну виборку одиниць спостереження – 100–200 мітохондрій. Використовується діапазон збільшень електронного мікроскопа від 6 до 10 тисяч як оптимальний для візуалізації деталей цитоплазми цілих клітин вказаного типу. Об'єктом спостереження вибрано незрілі гранулоцити кісткового мозку, з одного боку, з огляду чіткої прорисовки зображення мітохондрій на електронних мікрофотограмах цитоплазми цих клітин, з іншого, головним чином, тому, що генопаренхіма кісткового мозку є найважливішим радіаційно-критичним органом.

Феномен "псевдомієлінізація мембран мітохондрій" полягає в тому, що при опроміненні тварин в мітохондріях клітин з'являються ділянки просвітлення (розрідження) їх матриксу, в котрих відбувається також зникнення правильних крист (кристоліз). Але головне – в цих ділянках виникають спочатку точкові ущільнення, котрі, виростаючи, приймають форму кілець, завитків (whorls) із мембраноподібних структур, які характеризуються підвищеною щільністю (осміофілією) (fig. 1,2).

Запропонованим способом простежено наступні суттєві біологічні закономірності (табл. 1,2,3):

Очевидно, що ультраструктурні ознаки феномену "псевдомієлінізації мембран мітохондрій" (ПММ) вірогідно змінюються в залежності від дози опромінення, часу після нього і природно променевого фактору. Отже, вони можуть використовуватися як ранній кількісний діагностичний показник контакту клітин кісткового мозку *in situ* з іонізуючою радіацією різної інтенсивності і природи.

Приклад конкретного виконання.

Дві групи безпородних білих щурів-самців вагою по 120–150 г зазнавали одоразової тотальної дії різних джерел іонізуючого випромінювання в дозах, які забезпечували однаковий відносний біологічний ефект (ВБЕ).

Першу групу – 10 тварин піддавали гамма-опроміненню на телегаммаустановці "Рокс" з джерелом ^{60}Co і потужністю дози 100 Р/хв. протягом 30 сек при загальній поглинутій дозі 0,5 Гр на щура.

Другу групу – 10 тварин опромінено швидкими нейтронами ротаційним способом в спеціальному контейнері на виході горизонтального біоло-

гічного каналу ядерного реактора ВВР-М протягом 2,1 хвилини за допомогою дози 9 ± 2 Р/хв. і середньою енергією нейтронів в 1,6 МеВ при поглинутій дозі 0,2 Гр на щура (адекватна за ВБЕ 0,5 Гр при гамма-опроміненні).

Контрольну групу склали 10 практично здорових щурів-самців тієї ж ваги.

Після умертвіння опромінених тварин шляхом одномоментної декапітації або внутрішньовенної повітряної емболії розтинається кістково-мозковий канал стегнової кістки. Кістковий мозок вилучається атравматично і тканина його подрібнюється на шматочки діаметром не більше 1 мм³. Подрібнена тканина кісткового мозку фіксується протягом 1,5 години 1,6% розчином глютарового альдегіду в 0,1 М фосфатному буфері за Серенсе-ном при pH=7,3. Потім шматочки тканини промиваються протягом 20 годин в тому ж буфері і дофіксуються 2% розчином тетраоксиду осмію в тому ж буфері протягом 1,5 години при температурі 4°C. Потім тканина зневоднюється в спиртах зростаючої концентрації та абсолютному ацетоні і заключається в комплекс епоксидних смол "Епон". Ультратонкі зрізи з епонованих блоків виготовляються на ультрамикротомах ЛБК 8800 (Швеція) і контрастуються ураніл-ацетатом за Лафтом і цитратом свинцю за Рейнольдсом. Дослідження препаратів в електронному мікроскопі JEM-100B (Японія) при прискорюючій напрузі 60 кВ.

Кінцевий результат конкретного застосування способу приведено в таблиці 3.

Перевагами способу є:

- можливість застосування способу для визначення самих ранніх із всіх відомих морфологічних ефектів дії іонізуючої радіації до появи незворотних змін в першому поколінні клітинної популяції організму, тобто в інтерфазних клітинах;
- спосіб ефективний при ідентифікації дії малих (практично не летальних) доз опромінення;
- спосіб дозволяє реєстрацію "неядерних", цитоплазматичних ефектів опромінення.

Джерела інформації

- 1 Токин И.В. Проблемы радиационной цитологии. – 1974. – Л., Медицина. – 319 с.
- 2 Машанский В.Ф., Матиенко-Максимова Е.Б., Жилина З.П. и др. Явление раннего "всплеска" в структурных компонентах клетки // Известия АН Молд. ССР, серия биол. и хим. науки. – 1981. – № 4. – С. 5–15.
- 3 Шкурупий В.А. Ультраструктура синусоидального эпителия и купферовских клеток при множественном стрессовом воздействии // Цитология и генетика. – 1986. – Т.20, №5. – С. 335–340.
- 4 Воробьев Е.И., Степанов Р.П., Ионизирующее излучение и кровеносные сосуды. – Энергоатомиздат. М. – 1985. – 296 с. (прототип).

Таблиця 1

Залежність інтенсивності феномену ПММ від дози гамма-опромінення (через 30 хвилин після експозиції)

Норма (контроль)	0,5 Гр	2,5 Гр	10 Гр
7,8 (0,078)	12%(0,12) $P_{1,2}<0,001$	26%(0,26) $P_{1,3}<0,001$ $P_{2,3}<0,001$	31%(0,31) $P_{1,4}<0,001$ $P_{2,4}<0,001$ $P_{3,4}<0,001$

Таблиця 2

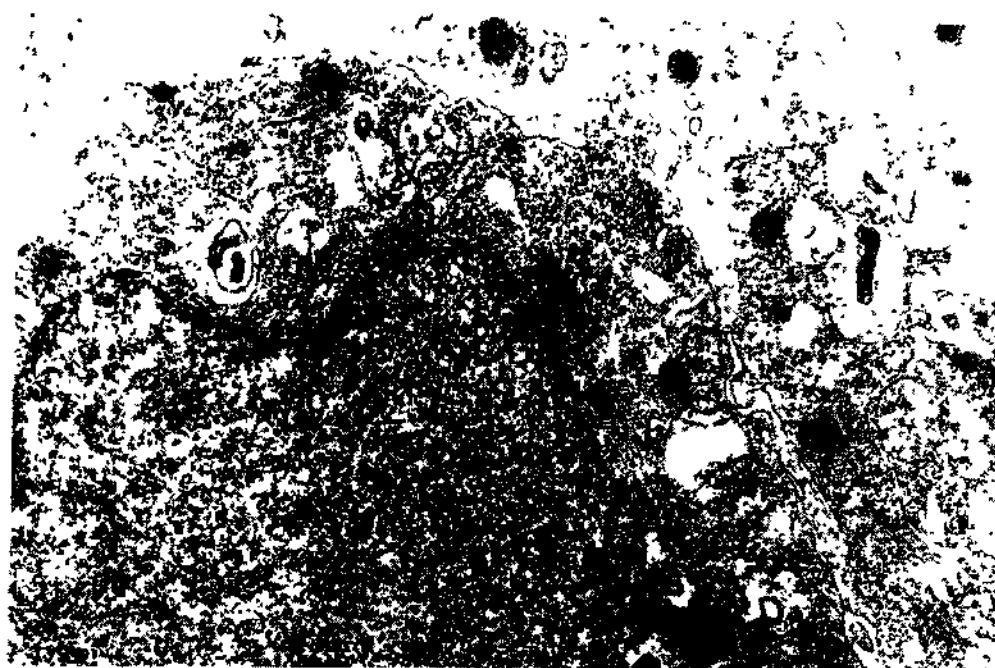
Залежність інтенсивності феномену ПММ від часу після гамма-променевої дії
(при дозі 2,5 Гр)

Одномоментна декалітація	Через 15 хвилин	Через 30 хвилин	Через 1 годину	Через 3 години	Через 1 добу	Через місяць
7,8% (0,078)	20,7% (0,207) $P_{1,2}<0,001$	26,2% (0,262) $P_{1,3}<0,001$ $P_{2,3}<0,001$	34,4% (0,344) $P_{1,4}<0,001$ $P_{2,4}<0,001$ $P_{3,4}<0,001$	37,8% (0,378) $P_{1,5}<0,001$ $P_{2,5}<0,001$ $P_{3,5}<0,001$ $P_{4,5}<0,001$	26,9% (0,269) $P_{1,6}<0,001$ $P_{2,6}<0,001$ $P_{3,6}<0,001$ $P_{4,6}<0,001$ $P_{5,6}<0,001$	8,7% (0,078) $P_{1,7}<0,001$ $P_{2,7}<0,001$ $P_{3,7}<0,001$ $P_{4,7}<0,001$ $P_{5,7}<0,001$ $P_{6,7}<0,001$

Таблиця 3

Залежність інтенсивності феномену ПММ від природи променевого фактору
(через 30 хвилин після експозиції)

Контроль	Гамма-опромінення (0,5 Гр)	Швидкі нейтрони (0,2 Гр)
7,8 (0,078)	12%(0,12) $P_{1,2}<0,001$	21%(0,21) $P_{1,3}<0,001$ $P_{2,3}<0,001$



Фіг. 1

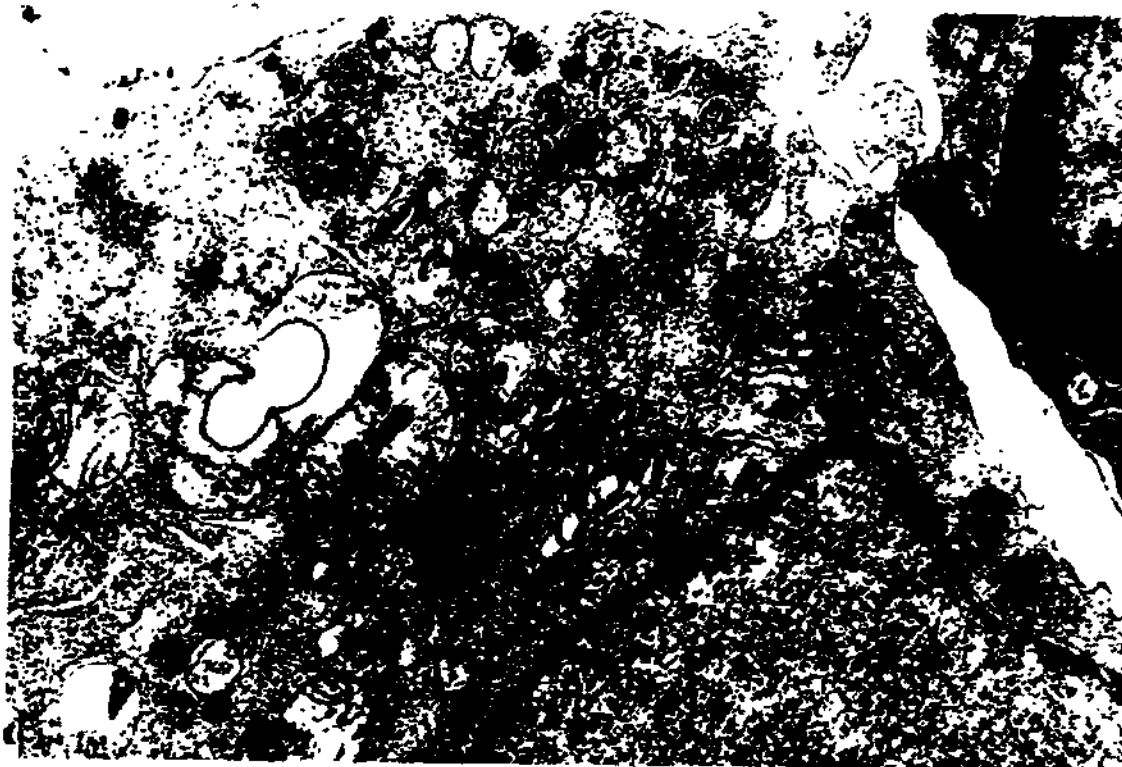


Fig. 2

Тираж 50 экз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 - 72 - 89 (03122) 2 - 57 - 03
