

А.Е. Антушевич¹, А.Г. Климов², А.Н. Гребенюк³,
Б.Л. Гаврилюк¹, А.В. Болехан¹, Е.Г. Богданова¹,
В.Я. Апчел^{1,4}, Л.Г. Аржавкина¹, А.С. Крючкова¹

Роль иммунодепрессивных состояний в отягощении изолированных радиационных и комбинированных химиолучевых поражений

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

⁴Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург

Резюме. В экспериментах на беспородных половозрелых белых мышьях-самцах массой 16–18 г изучена устойчивость к изолированному лучевому и комбинированному химиолучевому поражению. Моделирование лучевого поражения осуществляли путем γ -облучения животных в дозе 4,5 Гр (мощность дозы – 1,24 Гр/мин; расчетная летальная доза – 20% при 30-суточном наблюдении), комбинированного химиолучевого поражения – облучением мышшей в той же дозе на фоне сформировавшегося цитостатического иммунодефицита после однократного введения животным циклофосфамида в дозе 100 мг/кг. Иммунодефицит моделировали в двух вариантах: с преимущественным угнетением Т-клеточного (с помощью конканавалина А) или В-клеточного (с помощью продигозана) иммунитета. Оценивали выживаемость и среднюю продолжительность жизни погибших животных, их гематологический и иммунный статус. Установлено, что облучение, приводящее к гибели 20% мышшей с исходно интактной иммунной системой, на фоне Т-клеточного иммунодефицита сопровождалось ростом летальности до 90% в первые трое суток после облучения. Летальность облученных мышшей с В-иммунной недостаточностью составляла в среднем 60%. Выявлено, что резистентность к лучевой травме, вызванной γ -облучением, во многом зависит от типа иммунного реагирования. Наиболее чувствительным к этому виду воздействия является Т-звено иммунитета. Угнетение иммунологической реактивности в эксперименте приводило к существенному повышению чувствительности организма к радиационной травме и эндотоксину. Наиболее выраженные изменения наблюдались на модели Т-клеточного иммунодефицита, что свидетельствует о значимости Т-клеточного контроля в патогенезе постлучевой аутоинтоксикации.

Ключевые слова: иммунодепрессия, облучение, циклофосфамид, радиационное поражение, комбинированное радиационно-химическое поражение, экспериментальное исследование, выживаемость, моделирование, тип иммунного реагирования.

Введение. Особенности оказания догоспитальной медицинской помощи в условиях поражения населения при техногенных радиационных авариях и катастрофах требуют целенаправленного совершенствования прежде всего средств патогенетической и симптоматической терапии. Анализ результатов экспертных оценок, возможных причин развития патологии при поражениях экстремальными факторами физической (радиационной) и химической природы указывает на то, что основную угрозу для жизни пораженных будут представлять аутоинтоксикация и сепсис, обусловленные иммунологическими и гематологическими нарушениями [1, 2]. Вопросы профилактики токсемии и контроля за развитием инфекции на сегодняшний день являются чрезвычайно актуальными и нерешенными даже применительно к изолированным формам поражений (обширные повреждения мягких тканей, термические ожоги, острая лучевая болезнь (ОЛБ), отравления высокотоксичными веществами и др.). При ОЛБ судьба облученного организма опреде-

ляется прежде всего глубиной и длительностью лейко- и тромбоцитопении, которые в свою очередь зависят от сохранившихся после облучения стволовых кроветворных клеток [3, 4]. Именно это обстоятельство и определяет тактику лечения ОЛБ, которая базируется на проведении поддерживающей, заместительной и стимулирующей терапии – применении средств лечения инфекционных и геморрагических осложнений, а также использовании препаратов и процедур, направленных на ускорение восстановления угнетенного радиацией гемо- и иммунопоэза [3, 7, 8].

Цель исследования. Изучить роль нарушения процессов гемо- и иммуногенеза в формировании изолированных (радиационных) и комбинированных химиолучевых поражений различной степени тяжести.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на нелинейных половозрелых белых мышьях-сам-

цах массой 16–18 г. Животных получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). В течение 2 недель после получения животных выдерживали в карантине.

Лучевое поражение осуществляли путем γ -облучения животных на установке «ИГУР-1» в дозе 4,5 Гр (расчетная летальная доза – 20% при 30-суточном наблюдении) с мощностью дозы 1,24 Гр/мин. Моделирование химической компоненты комбинированного поражения осуществляли путем внутрибрюшинного введения мышам цитостатика циклофосфамида в дозе 100 мг/кг. Комбинированное химиолучевое поражение осуществляли облучением мышей в дозе 4,5 Гр на фоне сформировавшегося цитостатического иммунодефицита после однократного введения животным циклофосфамида в дозе 100 мг/кг.

В работе были использованы следующие химические соединения и фармакологические препараты:

- циклофосфамид фирмы «Baxter Oncology» (Германия), широко используемый в экспериментальных системах в качестве иммунодепрессанта;
- продигозан производственного объединения «Мосмедпрепараты им. Л.Я. Карпова» (Россия);
- липополисахарид (ЛПС) из *S. Marcescens*;
- конканавалин А (Кона) фирмы «ПанЭко» (Россия) – стерильный лиофилизированный порошок по 5 мг во флаконе.

Моделирование иммунодефицита проводили по методике Т.В. Кондратьевой с соавт. [6] в двух вариантах: преимущественным угнетением Т-клеточного или В-клеточного иммунитета. За двое суток до однократной внутрибрюшинной инъекции циклофосфамида в дозе 100 мг/кг мышам внутрибрюшинно вводили стимулятор Т-клеток (Кона – 10 мг/кг) или В-клеток (ЛПС – 0,5 мг/кг). Исследования проводили спустя 7 суток после применения циклофосфамида. Оценивали выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей, их гематологический и иммунный статус. Гематологические исследования проводили с помощью унифицированных стандартных методик.

Иммунный статус животных оценивали по следующим показателям: относительная масса тимуса, селезенки и лимфоузлов, количество лейкоцитов в крови, число антителообразующих клеток (АОК) по Эрне и Нордин [11] и количество розеткообразующих клеток (Е-РОК) в селезенке по Zaalberg [15]. Условия иммунизации такие же, как и при оценке количества АОК.

Мышей иммунизировали внутривенным введением эритроцитов барана в количестве 2×10^8 клеток. АОК определяли через четверо суток после иммунизации [9].

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) оценивали после однократной внутривенной иммунизации мышей эритроцитами барана (2×10^5 клеток) в 0,05 мл физиологического раствора. Для выявления сенсibilизации на 5-е сутки мышам

вводили 2×10^8 эритроцитов барана в 0,05 мл физиологического раствора в подушечку задней лапы. В контралатеральную лапу вводили физиологический раствор в том же объеме. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч по различию массы опытной (Р_о) и контрольной (Р_к) лап. Для каждого животного вычисляли индекс реакции [11].

Полулетальную дозу эндотоксина определяли с помощью системы пробит-анализа по методике Литчфильда и Уилкоксона [12]. Процент выживших животных со значимым интервалом для вероятности 95% определяли с помощью таблиц В.С. Генеса [5]. Значимость различий других исследуемых показателей определяли по критериям Стьюдента и Фишера [12].

Результаты и их обсуждение. Введение экспериментальным животным цитостатика в дозе 100 мг/кг сопровождалось выраженным угнетением костномозгового кроветворения. Облучение животных в нелетальных дозах вызывало гемодепрессивное состояние, наиболее выраженное на 10-е сутки после радиационного воздействия с последующей нормализацией к 20-м суткам. С учетом этих данных представлялось важным изучение устойчивости экспериментальных животных к комбинированному поражению (радиационно-химическому), то есть определение реакции организма на γ -облучение на фоне сформировавшегося цитостатического иммунодефицита. Через двое суток после введения циклофосфамида животных облучали в дозе 4,5 Гр. Исследования проводили через 5 суток после облучения, каждая группа состояла из 10 мышей (табл. 1).

Установлено, что изолированное воздействие двух повреждающих факторов (химического и радиационного) сопровождалось развитием у животных иммунодепрессивного состояния. Через двое суток после однократного внутрибрюшинного введения животным циклофосфамида в дозе 100 мг/кг относительная масса тимуса и селезенки снизилась более чем в 2 раза по сравнению с интактными животными. Количество лейкоцитов было ниже в среднем на 50% ($p < 0,05$). Количество антител к эритроцитам барана снизилось более чем в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Практически нелетальное облучение на фоне сформировавшегося у животных иммунодефицита усугубляло их состояние и приводило к увеличению летальности с 20 до 50% при 30-суточном наблюдении.

Спустя 5 суток после облучения относительная масса лимфоидных органов у животных была значительно ниже, чем в условиях изолированного воздействия каждого из повреждающих агентов. Аналогичные изменения обнаружены в количестве лейкоцитов, а также способности к антителопродукции в ответ на иммунизацию эритроцитами барана. Следовательно, при данном варианте комбинированного воздействия ведущая роль в иммуносу-

Таблица 1

Иммунологические показатели у мышей при комбинированном радиационно-химическом поражении

| Показатель | Интактные животные | Облучение | Циклофосфамид | Циклофосфамид + облучение |
|---|--------------------|--------------|---------------|---------------------------|
| Масса тимуса, г | 0,065±0,016 | 0,039±0,004* | 0,042±0,005* | 0,02±0,004 |
| Масса селезенки, г | 0,240±0,013 | 0,135±0,030* | 0,180±0,04* | 0,120±0,03* |
| Лейкоциты, ×10 ⁹ /л | 5,80±0,62 | 3,10±0,28* | 4,40±0,41* | 1,80±0,21* |
| Титр антител к эритроцитам барана, ед. в мл | 4600±320 | 1880±120* | 1340±84* | 670±50* |
| ГЗТ (индекс реакции, у. е.) | 11,6±1,4 | – | 8,5±1,3* | 8,3±1,4* |
| Летальность, % | – | – | 20 | 50 |

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с интактными животными.

прессии принадлежит, несомненно, химическому компоненту, который значительно усиливает повреждающее действие радиации. Согласно данным А.К. Гуськовой [4], иммунодепрессивное действие циклофосфамида обусловлено преимущественным снижением численности иммунокомпетентных клеток.

Показано, что использование различных митогенов лимфоидных клеток давало возможность путем последующего введения мышам супрессивной дозы циклофосфамида воспроизводить иммунодефицит преимущественно по Т- или В-клеточному типу. Максимальное снижение функциональной активности иммунокомпетентных клеток наблюдалось на 5–7-е сутки (табл. 2).

Наиболее выраженное изменение лимфоидного аппарата наблюдалось у мышей с преимущественно Т-клеточным типом иммунной недостаточности. При В-иммунодефиците выявлено выраженное снижение относительной массы тимуса (в среднем на 40%, p<0,05), селезенки (более чем на 30%, p<0,05) и количества лейкоцитов (на 26%, p<0,05), что коррелировало с резким снижением числа Е-РОК (71%, p<0,02). Угнетение предварительно стимулированного пула Т-лимфоцитов привело к отсутствию способности к формированию ГЗТ. Продукция монокинов в ответ на введение индуцирующей дозы ЛПС

при обоих типах иммунодефицита была одинаковой. Гибель Т-иммунодефицитных мышей в течение 30 суток составляла в среднем 30%. На модели В-иммуносупрессии, а также при использовании одного циклофосфамида летальность не превышала 10%. Вторичный В-иммунодефицит по сравнению с Т-иммунодефицитом характеризовался преимущественным угнетением (на 50%, p<0,05) числа АОК.

Описанные модели вторичного иммунодефицита были использованы для выяснения значимости Т- и В-систем иммунитета в патогенезе пострadiационного синдрома и эндотоксемии. С этой целью предусматривалось проведение экспериментов по изучению устойчивости мышей с различным типом иммунодефицита к лучевой травме и введению эндотоксина. Установлено, что облучение, приводящее к гибели 20% мышей с исходно интактной иммунной системой, на фоне Т-клеточного иммунодефицита сопровождалось ростом летальности в первые трое суток после облучения до 90% животных, что не позволяло провести дальнейшие иммунологические эксперименты.

Летальность облученных мышей с В-иммунной недостаточностью составляла в среднем 60% (табл. 3).

Основные проявления модифицирующего влияния В-клеточного иммунодефицита на течение лучевого

Таблица 2

Показатели иммунитета у мышей с Т- и В-клеточным иммунодефицитом

| Показатель | Интактные животные | ЦФ-иммунодефицит ^-иммунодефицит | | |
|--|--------------------|----------------------------------|----------------------|---------------|
| | | Кона+ЦФ (Т-клеточный) | ЛПС+ЦФ (В-клеточный) | ЦФ (контроль) |
| Масса тимуса, г | 0,062±0,004 | 0,034±0,005^ | 0,056±0,003 ° | 0,055±0,003 ° |
| Масса селезенки, г | 0,240±0,060 | 0,270±0,030^ | 0,310±0,050* | 0,246±0,020 |
| Лейкоциты, ×10 ⁹ /л | 5,08±0,04 | 3,25±0,28^ | 2,65±0,49^ | 1,32±0,33 ° |
| Количество АОК/селезенку, ×10 ³ | 43,30±1,50 | 8,60±0,36^ | 4,24±0,27 ^ | 17,30±1,05^ |
| Количество Е-РОК, % | 26,40±4,69 | 3,33±0,76^ | 11,60±3,92^ | 12,00±1,14 ° |
| ГЗТ, у. е. | 6,3±1,2 | 1,7±0,3* | 4,7±0,8* | 4,8±1,2* |
| Летальность, % | 0±5 | 30±10 | 10±7 | 10±7 |

Примечание: различия по сравнению с интактными животными, * – p<0,05; ° – p<0,01; ^ – p<0,001.

Таблица 3

Иммунологические показатели при общем γ -облучении мышей на фоне Т- и В-клеточного иммунодефицита

| Показатель | Интактные животные | γ -облучение в дозе 4,5 Гр | Облучение+иммунодефицит | |
|--|--------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | | Т-клеточный (Кона+ЦФА) | В-клеточный (ЛПС+ЦФА) |
| Масса тимуса, г | 0,062± | 0,028± | – | 0,031± |
| Масса селезенки, г | 0,250± | 0,250± | – | 0,180± |
| Лейкоциты, $\times 10^9$ /л | 6,32± | 3,20± | – | 2,40± |
| Количество АОК/ селезенку, $\times 10^3$ | 52,4± | 20,4± | – | 17,6± |
| ГЗТ (индекс реакции, у. е.) | 7,5± | 3,1± | – | 2,8± |
| Активность ФНО-а, ЕД/л | <80 | 2560± | – | 320± |
| Летальность, % | – | 20± | 90± | 60± |

Примечание: различия по сравнению с интактными животными, * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

синдрома были аналогичны действию иммунодепрессантов. В условиях В-иммунодефицита у облученных мышей возникла стойкая лейкопения со снижением числа лейкоцитов до $2,4 \times 10^9$ /л. Уже к исходу третьих суток в сыворотке крови животных с комбинированной (химиолучевой) травмой также регистрировалась низкая активность опухолекротизирующего фактора. Таким образом, состояние повышенной чувствительности к лучевой травме, вызванной иммунодепрессией, во многом зависит от типа иммунного реагирования. Наиболее чувствительным к этому виду воздействия является Т-звено иммунитета.

С учетом патогенетической роли эндотоксинов в раннем постлучевом периоде были проведены эксперименты по оценке устойчивости мышей к ЛПС на фоне Т- и В-клеточного иммунодефицита. Установлено, что иммунодефицит существенно повышал чувствительность мышей к эндотоксину. Наибольшая летальность наблюдалась у животных с недостаточностью иммунитета по Т-клеточному типу (см. табл. 2).

Угнетение иммунологической реактивности приводит к существенному повышению чувствительности организма к радиационной травме и эндотоксину. Наиболее выраженные изменения наблюдались на модели Т-клеточного иммунодефицита, что свидетельствует о значимости Т-клеточного контроля в патогенезе постлучевой аутоинтоксикации. Вероятно, применение средств, положительно влияющих на процессы пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, может оказаться одним из альтернативных путей восстановления иммунной реактивности организма в условиях рассматриваемых вариантов комбинированных радиационно-химических поражений.

Заключение. Установлено, что состояние резистентности к лучевой травме, вызванной γ -облучением, во многом зависит от типа иммунного реагирования. Наиболее чувствительным к этому виду воздействия является Т-звено иммунитета. Угнетение иммунологической реактивности приво-

дит к существенному повышению чувствительности организма к радиационной травме.

Литература

1. Аклеев, А.В. Модификация радиационных иммунных ответов / А.В. Аклеев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 5. – С. 517–527.
2. Гребенюк, А.Н. Перспективные направления фармакологической коррекции пострадиационных нарушений иммунитета / А.Н. Гребенюк [и др.] // Воен.-мед. журн. – 2006. – Т. 327, № 8. – С. 49–53.
3. Гребенюк, А.Н. Основы радиобиологии и радиационной медицины / А.Н. Гребенюк [и др.]. – СПб.: Фолиант, 2012. – 232 с.
4. Гуськова, А.К. Актуальные вопросы клинической радиобиологии и пути их экспериментального разрешения / А.К. Гуськова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1997. – Т. 37, вып. 4. – С. 604–611.
5. Генес, В.С. Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований / В.С. Генес. – М.: Наука, 1967. – 203 с.
6. Кондратьева, Т.К. Новые экспериментальные модели Т-клеточного и В-клеточного иммунитета / Т.К. Кондратьева, Н.В. Михеева, Л.Н. Фонталин // Актуальные вопросы теоретической и прикладной инфекционной иммунологии. Механизмы противoinфекционного иммунитета. – М.: Б. и., 1987. – С. 63–64.
7. Легеза, В.И. Комбинированные радиационные поражения и их компоненты / В.И. Легеза, А.Н. Гребенюк, В.В. Бояринцев. – СПб.: Фолиант, 2015. – 216 с.
8. Легеза, В.И. Радиобиология, радиационная физиология и медицина: словарь-справочник / В.И. Легеза [и др.] – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: Фолиант, 2017. – 176 с.
9. Минаева, Л.В. Экспериментальная оценка роли изменений системы глутатиона в реализации побочных цитотоксических эффектов повторного введения циклофосфана / Л.В. Минаева: дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2007. – 178 с.
10. Неменова, Ю.М. Методы лабораторных клинических исследований / Ю.М. Неменова. – М.: Медицина, 1972. – 424 с.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Мионов [и др.]. – Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2013. – 944 с.
12. Юнкеров, В.И., Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – СПб.: ВмедА, 2002. – 266 с.
13. Ярилин, А.А. Радиация и иммунитет. Вмешательство ионизирующих излучений в ключевые иммунные процессы / А.А. Ярилин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, № 1. – С. 181–189.

14. Neta, R. Modification with cytokines of radiation injury: suggested mechanisms of action / R. Neta // Environ. Health Prospect. – 1997. – Vol. 105, Suppl. 6. – P. 1463–1468.
15. Zaalberg, O.B. A simple method for detecting single antibody-forming cells / O.B. Zaalberg // Nature. – 1964. – № 202. – P. 1231–1236.

A.E. Antushevich, A.G. Klimov, A.N. Grebenyuk, B.L. Gavriyuk, A.V. Bolekhan,
E.G. Bogdanova, V.Ya. Apchel, L.G. Arzhavkina, A.S. Kryuchkova

**The role of immunodepressive states in the burdening
of isolated radiation injures and combined radiation-chemical injuries**

Abstract. *The resistance of experimental animals to isolated radiation and combined chemoradiation injures was studied in experiments on outbred adult white mice weighing 16–18 g. Simulation of radiation injury was carried out by γ -irradiation of animals at a dose of 4,5 Gy (dose rate 1,24 Gy/min; calculated estimated lethal dose of 20% at 30 daily observation), and combined chemoradiation injury – by irradiation of mice at the same dose against the background of a formed cytostatic immunodeficiency after a single injection of cyclophosphamide at a dose of 100 mg/kg. Simulation of immunodeficiency in mice was performed in two versions: with predominantly inhibition of the T-cell (using concanavalin A) or B-cell (using prodigiosan) immunity. The survival and average life expectancy of the dead animals, their hematological and immune status was assessed. It was found that exposure, leading to the death of 20% of mice with the original intact immune system, against the background of T-cell immunodeficiency was accompanied by an increase in mortality of up to 90% in the first 3 days after exposure of animals. Mortality of irradiated mice with B-immune deficiency averaged 60%. It has been established that the state of resistance to radiation injury caused by gamma radiation depends largely on the type of immune response. The most sensitive to this type of exposure is T-cell immunity. Inhibition of immunological reactivity led to a significant increase in the body's sensitivity to radiation injury and endotoxin. The most pronounced changes were observed on the model of T-cell immunodeficiency, which indicates the importance of T-cell control in the pathogenesis of post-radiation autointoxication.*

Key words: *immunodepression, irradiation, cyclophosphamide, radiation injuries, combined radiation-chemical injuries, experimental study, survival, modeling, type of immune response.*

Контактный телефон: +7-921-946-52-70; e-mail: vmeda-nio@mil.ru