

На правах рукописи

ГАМОВА ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**МЕХАНИЗМЫ РАДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ
ЗООТОКСИНОВ НА СИСТЕМУ КРОВЕТВОРЕНИЯ КРЫС ПРИ
ОДНОКРАТНОМ И ФРАКЦИОНИРОВАННОМ ГАММА-
ОБЛУЧЕНИИ**

03.00.13 – физиология

03.00.04 – биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Нижний Новгород

2007

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Крылов Василий Николаевич
кандидат биологических наук, доцент
Корягин Александр Сергеевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Гелашвили Давид Бежанович
доктор биологических наук, профессор
Конторщикова Клавдия Николаевна

Ведущая организация:

Нижегородская государственная медицинская академия

Защита состоится 23 мая 2007г. в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н. И. Лобачевского (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ

Автореферат разослан 23 апреля 2007г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доцент, к.б.н.

А.С. Корягин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Проблема снижения радиочувствительности биологических объектов является одной из центральных в современной радиобиологии. Обострение радиозэкологической ситуации ставит новые задачи в поиске средств защиты от однократного, фракционированного (многократного), а также хронического облучения. Эффективность классических радиопротекторов резко снижается в условиях фракционированного облучения, а также при снижении мощности воздействия (Гончаренко, Кудряшов, 1996; Ярмоненко, Вайнсон, 2004). В решении указанной проблемы важная роль принадлежит поиску противолучевых средств природного происхождения, объединенных в группу адаптогенов, которая включает зоо- и фитопрепараты, в том числе и зоотоксины (Васин, 1999; Кудряшов, Гончаренко, 1999).

Зоотоксины представляют собой сложные, многокомпонентные смеси, которые могут одновременно воздействовать на многие регуляторные и исполнительные системы организма и обладают высокой биологической активностью, а также способностью вызывать общие адаптационные ответные реакции: стресс, активация, тренировка (Крылов, 1990; Корягин, Ерофеева, 2004). Это позволило предположить наличие у них адаптогенных свойств и способность повышать неспецифическую резистентность при воздействии неблагоприятных факторов различной природы.

Костный мозг является критическим органом, состояние которого определяет глубину радиационного поражения и вероятность гибели облученного организма (Материй и др., 2003). Количество выживших кроветворных клеток, степень ингибирования процессов клеточного деления, а также уровень хромосомных aberrаций определяют способность кроветворной ткани к регенерации (Ярмоненко, Вайнсон, 2004). Возможное радиозащитное действие ядов животных на процессы пролиферации и генетический материал кроветворных клеток практически не исследовано.

В связи с вышесказанным в работе эти показатели были выбраны в качестве критериев оценки противолучевых эффектов зоотоксинов.

На основании существующих предпосылок была изучена возможность многократного введения животным малых (в десятки раз ниже летальных) доз ядов пчелы медоносной (*Apis mellifera*), жабы зеленой (*Bufo viridis*) и саламандры пятнистой (*Salamandra salamandra*) для защиты системы кроветворения в условиях однократного и фракционированного γ -облучения. Кроме того, исследовано состояние красного костного мозга и активность свободнорадикальных процессов в сыворотке крови при курсовом введении зоотоксинов экспериментальным животным в условиях относительной нормы.

Цель работы

Изучить механизмы радиозащитного действия курсового введения малых доз ядов пчелы, жабы и саламандры на систему кроветворения лабораторных животных в условиях однократного и фракционированного (многократного) γ -облучения в дозах 1,5 и 3,0 Гр.

Задачи

1. Исследовать влияние курсового введения малых доз ядов пчелы, саламандры и жабы на состояние красного костного мозга (общее количество кроветворных клеток, уровень их пролиферативной активности, процентное содержание aberrантных метафаз) и процессы свободнорадикального окисления (СРО) (определение параметров индуцированной хемилюминесценции) в сыворотке крови крыс в условиях относительной нормы.

2. Оценить профилактическое радиозащитное действие ядов пчелы, жабы и саламандры на систему кроветворения лабораторных животных в условиях общего однократного γ -облучения в дозах 1,5 и 3,0 Гр по количеству клеток красного костного мозга, митотическому индексу, уровню хромосомных aberrаций и концентрации малонового диальдегида (МДА) в крови.

3. Определить радиопротекторное действие предварительного введения ядов пчелы, жабы и саламандры на красный костный мозг лабораторных животных при фракционированном γ -облучении в суммарных дозах 1,5 и 3,0 Гр по количеству кроветворных клеток, их митотической активности, проценту аберрантных клеток и уровню МДА в крови.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что многократное введение ядов пчелы, жабы и саламандры в дозах, вызывающих формирование адаптационной реакции устойчивой активации, сопровождается снижением активности свободнорадикальных процессов в сыворотке крови и ингибированием (за исключением яда жабы) активности процессов пролиферации в кроветворной ткани костного мозга лабораторных животных. Установлено, что исследуемые зоотоксины не оказывают повреждающего действия на генетические структуры кроветворных клеток.

Впервые выявлено, что многократное профилактическое введение крысам малых доз ядов пчелы, жабы и саламандры сопровождается развитием резистентности, позволяющей успешно защищать красный костный мозг в условиях однократного γ -облучения в дозах 1,5 и 3,0 Гр. К наиболее значимым среди выявленных механизмов радиозащитного действия исследуемых зоотоксинов можно отнести повышение устойчивости кроветворных клеток, уровня их пролиферативной активности и снижение активности процессов перекисного окисления липидов в крови животных.

Впервые обнаружено, что введение зоотоксинов сопровождается развитием длительной радиорезистентности и снижает повреждающее воздействие ионизирующей радиации на систему кроветворения, в частности на генетический материал кроветворных клеток в условиях фракционированного γ -облучения.

Практическая и теоретическая значимость работы

Исследование радиозащитного действия курсового введения малых доз ядов саламандры, пчелы и жабы на пролиферативную активность и

генетический материал кроветворных клеток в условиях однократного и фракционированного γ -облучения позволяет расширить представления о механизмах неспецифической радиорезистентности и предполагает возможность создания на основе этих биологически активных веществ препаратов-адаптогенов, повышающих радиорезистентность организма. Практическая значимость применения зоотоксинов в малых дозах заключается в том, что они могут рассматриваться как препараты выбора в условиях фракционированного и, возможно, хронического воздействия ионизирующей радиации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Адаптационная реакция устойчивой активации, вызванная многократным введением крысам зоотоксинов, сопровождается возникновением состояния радиорезистентности системы кроветворения в условиях общего однократного γ -облучения в дозах 1,5 и 3,0 Гр.

2. Состояние радиорезистентности, развивающееся в ответ на многократное введение ядов пчелы, жабы и саламандры, является длительным и позволяет успешно защищать систему кроветворения в условиях фракционированного γ -облучения в суммарных дозах 1,5 и 3,0 Гр, увеличивая количество выживших кроветворных клеток (за исключением яда саламандры) и повышая их пролиферативную активность у крыс.

3. Курсовое введение малых доз зоотоксинов саламандры, пчелы и жабы, приводящее к развитию адаптационной реакции устойчивой активации, снижает активность свободнорадикальных процессов; не оказывает мутагенного действия; ингибирует (за исключением яда жабы) пролиферативную активность кроветворной ткани красного костного мозга у интактных животных.

Апробация работы

Результаты работы были обсуждены на III Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в системе образования» (Тамбов, 2005, 2006), VIII Всероссийском

популяционном семинаре «Популяции в пространстве и времени» (Нижний Новгород, 2005), конференции Сибирского государственного медицинского университета «Естествознание и гуманизм» (Томск, 2005), III Европейском конгрессе «European Congress on Social Insects» (Санкт-Петербург, 2005), 10-й международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2006), VIII международном конгрессе «International society for adaptive medicine (ISAM)» (Москва, 2006), XII Всероссийской научно-практической конференции «Апитерапия сегодня» (Рыбное, 2006), XI Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2006).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа в объеме 111 листов состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка литературы. Библиографический указатель включает 177 источников литературы (137 отечественных и 40 иностранных). Диссертация иллюстрирована 25 таблицами и 9 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа была проведена на 216 нелинейных крысах обоего пола массой 200–250 г. В опытах использовали яд пчелы медоносной (*Apis mellifera* L.), саламандры пятнистой (*Salamandra salamandra* L.) и жабы зеленой (*Bufo viridis* Laur.). Животным внутрибрюшинно, ежедневно в течение 7 дней вводили яд саламандры в дозе 0,5 мг/кг, яды жабы и пчелы – в дозе 0,1 мг/кг. Яд пчелы растворяли в физиологическом растворе, яды жабы и саламандры – в 12 % этаноле, приготовленном на физиологическом растворе. Объем вводимой дозы составлял 0,2 мл. Животным контрольных групп вводили соответствующий растворитель (для пчелиного яда – физиологический раствор, для ядов жабы и саламандры – 12 % этанол) в том же объеме.

Выбор доз, вызывающих развитие адаптационной реакции устойчивой активации, обусловлен соответствующими данными литературы (Корягин, Ерофеева, 2004). Зоотоксины различаются по токсичности на уровне полулетальной дозы (DL_{50}). Для мышей такие дозы составляют 8–10 мг/кг яда пчелы, 28–30 мг/кг яда саламандры и 58–60 мг/кг жабьего яда (Крылов, 1990).

Было проведено 5 серий экспериментов в опытах *in vivo*. Общее распределение животных по сериям представлено в табл. 1.

Таблица 1

Общее количество экспериментальных животных и их распределение по сериям

Серии исследований	Доза γ -облучения, Гр	Количество животных
Исследование влияния курсового введения малых доз зоотоксинов на состояние красного костного мозга и процессы СРО в сыворотке крови	—	36
Изучение радиозащитного действия профилактического курсового введения зоотоксинов при однократном общем γ -облучении	1,5	42
	3,0	42
Изучение радиозащитного действия профилактического курсового введения зоотоксинов при фракционированном γ -облучении	0,3× 5 дней (суммарная доза 1,5)	54
	0,6× 5 дней (суммарная доза 3)	42

В первой серии экспериментов для исследования влияния малых доз зоотоксинов на состояние красного костного мозга и процессы СРО в крови крыс яды пчелы, саламандры и жабы вводили в исследуемых дозах в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки. На следующие сутки после окончания инъекций определяли митотический индекс, процентное содержание клеток с хромосомными aberrациями и общее количество клеток костного мозга. Используя метод H_2O_2 и Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции (БХЛ), оценивали интенсивность процессов СРО и активность антиоксидантных систем в сыворотке крови.

Задачей второй и третьей серии экспериментов было исследование радиопротекторных свойств зоотоксинов в условиях однократного общего γ -облучения. Яды вводили предварительно перед облучением в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки. На следующие сутки после окончания инъекций животные подвергались однократному общему γ -облучению (^{60}Co) на терапевтической установке «АГАТ-С» на базе Нижегородского городского онкологического диспансера. Во второй серии экспериментов доза облучения составляла 1,5 Гр, в третьей – 3,0 Гр. Мощность дозы – 1,0 Гр/мин. Через сутки после облучения определяли митотический индекс, процентное содержание клеток с хромосомными aberrациями и общее количество клеток костного мозга, а также концентрацию МДА в крови. Известно, что γ -облучение в дозе 1,5 Гр приводит к развитию лучевой реакции у крыс, а доза однократного облучения 3,0 Гр вызывает костномозговую форму лучевой болезни легкой степени тяжести (Бесядовский и др., 1978). Таким образом, выбранные нами дозы не вызывают значительного опустошения красного костного мозга, что позволяет исследовать состояние кроветворной ткани уже в ранние сроки после воздействия радиации.

Четвертая и пятая серии экспериментов были посвящены изучению защитных свойств ядов саламандры, пчелы и жабы при фракционированном γ -облучении. Зоотоксины в исследуемых дозах вводили крысам

профилактически в течение 7 дней. Животных подвергали облучению в течение 5 дней ежедневно в дозе 0,6 Гр в день – четвертая серия и 0,3 Гр – пятая серия экспериментов. Мощность дозы – 1 Гр/мин. Первому облучению животные подвергались на следующие сутки после введения последней инъекции. Через сутки после последнего облучения определяли митотический индекс, процентное содержание клеток с хромосомными aberrациями и общее количество клеток костного мозга, а также концентрацию МДА в крови.

Через сутки после окончания воздействий осуществляли забор крови из подъязычной вены и выделяли красный костный мозг из бедренных костей. Определение всех показателей проводили по стандартным методикам:

1. Подсчет общего количества клеток костного мозга проводили по методу Горизонтова (Горизонтов и др., 1983).
2. Для проведения цитогенетического анализа готовили препараты метафазных хромосом клеток костного мозга крыс (Макгрегор, Варли, 1986).
3. Для определения митотического индекса подсчитывали долю клеток красного костного мозга в стадии метафазы (Методы..., 1974).
4. Определение концентрации МДА в крови проводили по стандартной методике (Владимиров, Арчаков, 1972).
5. Оценку интенсивности процессов СРО проводили методом БХЛ на биохемилюминиметре БХЛ-06 (Кузьмина, 1983).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ BIOSTAT и Statistica v. 6.0. Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. При расчете t-критерия Стьюдента применяли поправку Бонферрони, позволяющую устранить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более чем двух выборок данным методом. При статистической обработке данных цитогенетических исследований использовали критерий χ^2 (хи-квадрат) (Гланц, 1999; Реброва, 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. При исследовании влияния многократного введения малых доз ядов саламандры, пчелы и жабы на состояние красного костного мозга лабораторных животных в условиях относительной нормы было показано, что яды пчелы и саламандры статистически значимо снижали уровень пролиферативной активности кроветворных клеток по отношению к интактным и контрольным животным ($p < 0.05$) (табл. 2).

Таблица 2

Митотический индекс клеток костного мозга крыс после курсового введения зоотоксинов

Группы животных	Митотический индекс, ‰
Интактные	$23,0 \pm 1,0$
Контроль для пчелиного яда (физ. р-р)	$19,0 \pm 1,0$
Яд пчелы (0,1 мг/кг)	$5,5 \pm 0,9 * ^+$
Контроль для ядов жабы и саламандры (12 % этанол)	$24,0 \pm 2,0$
Яд жабы (0,1 мг/кг)	$27,0 \pm 2,0$
Яд саламандры (0,5 мг/кг)	$14,0 \pm 1,5 * ^+$

Примечания: статистически значимые отличия: * – $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; + – $p < 0.05$ по отношению к контролю.

Вероятно, компоненты этих зоотоксинов оказывают активирующее действие на гипоталамо–гипофизарную систему, в результате чего увеличивается секреция АКТГ, что приводит к повышению уровня глюкокортикоидов, которые снижают митотическую активность кроветворных клеток костного мозга.

При исследовании влияния малых доз зоотоксинов на активность свободнорадикальных процессов в сыворотке крови методом БХЛ показано, что курсовое введение ядов жабы и саламандры снижало активности СРО, о

чем свидетельствовало уменьшение параметра светосуммы (S) по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$) (табл. 3).

При введении пчелиного яда наблюдалась тенденция к снижению данного показателя ($0.05 < p < 0.1$). Исследуемые яды не оказывали влияния на значение максимальной интенсивности сигнала (I_{\max}) и антиоксидантный потенциал сыворотки крови (tg2) ($p > 0.05$) (табл. 3).

Таблица 3

Параметры хемилюминесценции сыворотки крови крыс после курсового введения зоотоксинов

Группы животных	S	I_{\max}	tg2
Интактные	92,38 ± 5,21	26,59 ± 3,17	14,30 ± 1,92
Контроль для пчелиного яда (физ. р-р)	92,32 ± 1,58	27,72 ± 1,57	15,87 ± 1,46
Яд пчелы (0,1 мг/кг)	79,05 ± 2,70	27,38 ± 1,89	14,76 ± 2,27
Контроль для ядов жабы и саламандры (12 % этанол)	90,75 ± 2,36	25,93 ± 1,50	14,80 ± 1,08
Яд жабы (0,1 мг/кг)	75,12 ± 2,35* ⁺	24,21 ± 2,17	12,94 ± 1,36
Яд саламандры (0,5 мг/кг)	76,76 ± 6,65*	20,48 ± 1,80	10,74 ± 1,40

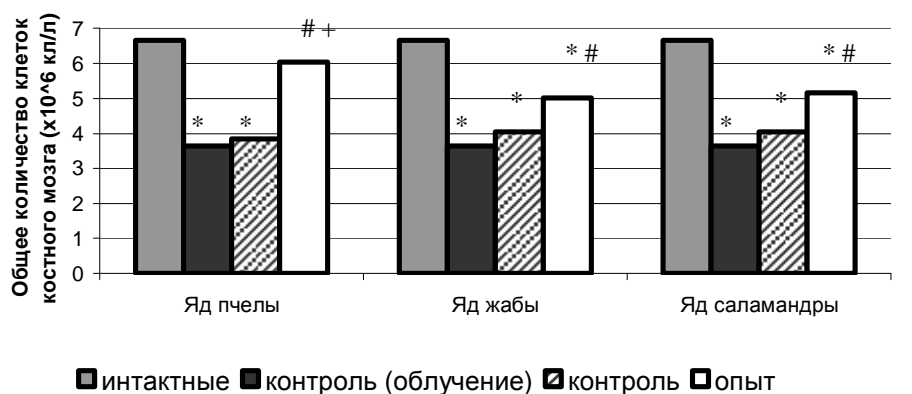
Примечания: статистически значимые отличия: * – $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; ⁺ – $p < 0.05$ по отношению к контролю.

Малые дозы исследуемых зоотоксинов при многократном введении не оказывали влияния на общее количество кроветворных клеток и не обладали мутагенным действием, не увеличивая уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс ($p > 0.05$).

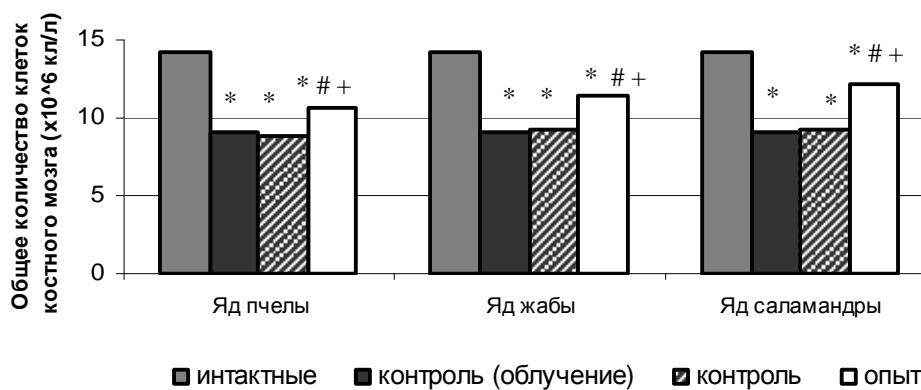
Таким образом, первая серия экспериментов показала, что курсовое введение малых дозы ядов саламандры, пчелы и жабы, вызывающих развитие общей адаптационной реакции устойчивой активации, сопровождалось снижением активности свободнорадикальных процессов и

ингибированием (за исключением яда жабы) пролиферативной активности кроветворных клеток. Зоотоксины не оказывали мутагенного действия на клетки кроветворной ткани красного костного мозга.

2. При исследовании радиопротекторных свойств малых доз ядов пчелы, жабы и саламандры в условиях однократного γ -облучения, у животных группы «контроль на облучение» наблюдалось снижение общего количества клеток костного мозга приблизительно на 45 % при облучении в дозе 1,5 Гр (рис. 1 А) и на 35 % – в дозе 3,0 Гр (рис. 1 Б).



А



Б

Рис. 1. Общее количество кроветворных клеток костного мозга в 1 бедренной кости крыс, облученных однократно в дозе 1,5 (А) и 3,0 Гр (Б) после курсового введения зоотоксинов

Примечания: статистически значимые отличия: * – $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; # – $p < 0.05$ по отношению к группе контроль (облучение); + – $p < 0.05$ по отношению к контролю.

Все исследуемые зоотоксины приводили к увеличению количества выживших кроветворных в среднем на 40–60 % по сравнению с контролем при облучении в дозе 1,5 Гр (рис. 1 А). Профилактическое применение малых доз ядов пчелы, жабы и саламандры перед однократным общим γ -облучением в дозе 3,0 Гр также статистически значимо увеличивало выживаемость кроветворных клеток на 20–30 % по сравнению с контрольными группами животных (рис. 1 Б).

Однократное облучение крыс в дозах 1,5 и 3,0 Гр сопровождалось угнетением процессов пролиферации в кроветворной ткани красного костного мозга приблизительно в два раза по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$) (табл. 4).

Таблица 4

Митотический индекс клеток костного мозга крыс, облученных однократно в дозах 1,5 и 3,0 Гр после курсового введения зоотоксинов

Группы животных	Митотический индекс, %	
	Облучение в дозе 1,5 Гр	Облучение в дозе 3 Гр
Интактные	26,5 ± 2,1	23,7 ± 1,9
Контроль (облучение)	14,2 ± 1,5*	11,8 ± 1,5*
Контроль для пчелиного яда (физ. р-р)	17,0 ± 1,7 *	3,5 ± 0,2* #
Яд пчелы (0,1 мг/кг)	20,7 ± 1,8 #	8,2 ± 1,1* +
Контроль для ядов жабы и саламандры (12 % этанол)	19,3 ± 1,8 *	10,3 ± 0,3*
Яд жабы (0,1 мг/кг)	16,8 ± 1,7	7,8 ± 1,4*
Яд саламандры (0,5 мг/кг)	21,3 ± 1,9 #	21,3 ± 2,4 # +

Примечания: статистически значимые отличия: * – $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; # – $p < 0.05$ по отношению к группе контроль (облучение); + – $p < 0.05$ по отношению к контролю.

Наиболее выраженное защитное действие на делящиеся клетки в условиях однократного γ -облучения оказывал яд саламандры, статистически значимо увеличивая митотический индекс по сравнению с контрольными животными при облучении в обеих дозах ($p < 0.05$). Пчелиный яд наиболее эффективно оказывал защитное действие на процессы пролиферации в красном костном мозге при облучении в дозе 1,5 Гр. Яд жабы не влиял на пролиферативную активность кроветворной ткани в условиях однократного γ -облучения ($p > 0.05$). Вероятно, это обусловлено снижением митотической активности кроветворных клеток под действием курсового введения ядов пчелы и саламандры (табл. 2). Известно, что кратковременное ингибирование митотической активности родоначальных кроветворных клеток способствует их защите и сохранности и в последствии приводит к увеличению скорости восстановления гемопоэза (Романцев и др., 1980; Вернигорова, Лебедев, 1986).

Как известно, ионизирующая радиация является мощным мутагенным фактором и вызывает разнообразный спектр повреждений в генетическом материале клеток. Показано, что однократное облучение оказывало мутагенное действие на кроветворные клетки костного мозга и вызывало увеличение частоты аберрантных клеток в костном мозге приблизительно в 5 раз при облучении в дозе 1,5 Гр и в 10 раз – в дозе 3,0 Гр в контрольных группах по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$).

При облучении в дозе 1,5 Гр в группах животных, которым вводили яды пчелы и саламандры, процентное содержание аберрантных метафаз не отличалось от контрольных и интактных животных ($p > 0.05$). При курсовом введении жабьего яда наблюдалась тенденция к снижению уровня хромосомных aberrаций в костном мозге по отношению к группе «контроль на облучение» ($0.05 < p < 0.1$). При однократном облучении в дозе 3,0 Гр в опытных и контрольных группах животных не было обнаружено статистически значимых отличий по отношению к «контролю на облучение» ($p > 0.05$).

Для оценки активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) использовали определение концентрации МДА, являющегося количественным маркером данного процесса.

Однократное γ -облучение в дозе 3,0 Гр увеличивало содержание МДА в крови крыс по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$) (рис. 2). Все исследуемые зоотоксины снижали активность процессов ПОЛ, уменьшая концентрацию МДА в крови крыс по отношению к группе «контроль на облучение» ($p < 0.05$).

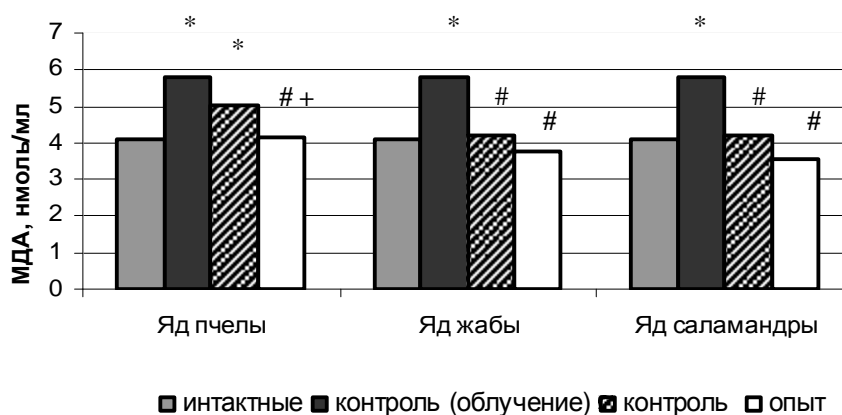


Рис. 2. Содержание МДА в крови крыс, облученных однократно в дозе 3,0 Гр после курсового введения зоотоксинов

Примечания: статистически значимые отличия * – $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; # – $p < 0.05$ по отношению к группе контроль (облучение); + – $p < 0.05$ по отношению к контролю.

При определении концентрации МДА в крови крыс, облученных однократно в дозе 1,5 Гр статистически значимых отличий между опытными и контрольными группами обнаружено не было ($p > 0.05$).

Таким образом, применение малых доз ядов саламандры, пчелы и жабы в условиях однократного γ -облучения в дозах 1,5 и 3,0 Гр снижало выраженность радиационных поражений красного костного мозга. Все исследуемые зоотоксины повышали устойчивость кроветворных клеток к повреждающему действию радиации, а яды саламандры и пчелы снижали

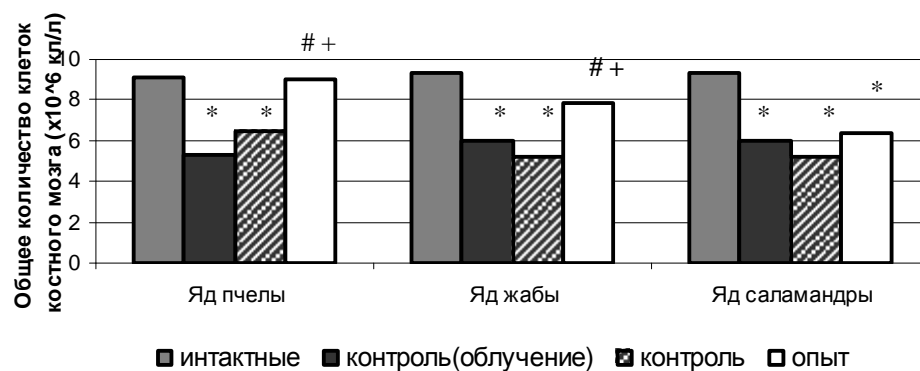
степень торможения митозов. Это способствовало увеличению клеточного фонда, который являлся источником последующей регенерации гемопоэза и ускорял нормализацию клеточного состава крови. Кроме того, исследуемые зоотоксины снижали активность процессов ПОЛ в крови животных при облучении в дозе 3,0 Гр и повреждающее действие радиации на генетические структуры кроветворных клеток при облучении в дозе 1,5 Гр.

Состояние радиорезистентности, вызванное курсовым введением малых доз исследуемых зоотоксинов, в основном обусловлено формированием адаптационной реакции устойчивой активации (Корягин, Ерофеева, 2004), которая сопровождается повышением неспецифической резистентности к действию повреждающих факторов различной природы. Это связано с индукцией защитных систем организма: антиоксидантной, системы цитохрома P₄₅₀, системы белков теплового шока (Меерсон, 1992; Гаркави и др., 1998).

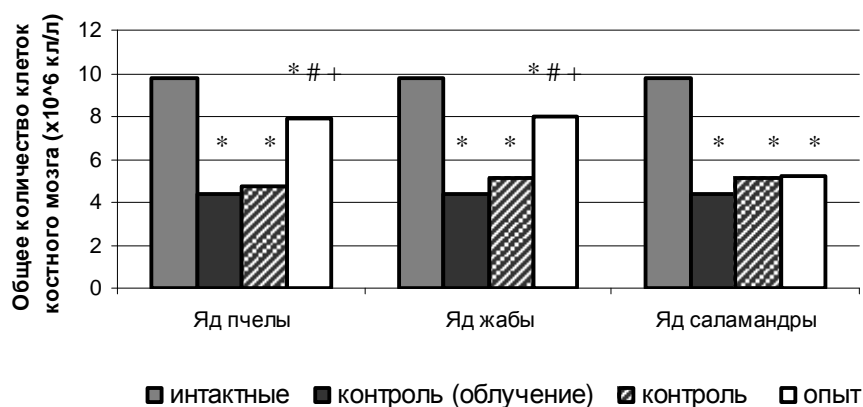
3. Состояние неспецифической резистентности при реакции устойчивой активации может длительно сохраняться (от 1–2 недель до 6 месяцев) и после прекращения воздействия (Гаркави и др., 1990). Это послужило предпосылкой для исследования радиозащитных свойств малых доз зоотоксинов в условиях фракционированного γ -облучения.

Показано, что под действием фракционированного γ -облучения в суммарной дозе 1,5 Гр в группе «контроль на облучение» происходит снижение общего количества клеток костного мозга в среднем на 35 % (рис. 3 А), при облучении в суммарной дозе 3,0 Гр на 45 % (рис. 3 Б) по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$).

Курсовое введение пчелиного яда и жабыего яда оказывало защитный эффект на красный костный мозг в обеих сериях экспериментов, увеличивая количество выживших кроветворных клеток в среднем на 35–40 % ($p < 0.05$) (рис. 3 А, Б). Яд саламандры не проявлял радиозащитных свойств в отношении системы кроветворения, не увеличивая общее количество клеток костного мозга по сравнению с контрольными группами животных ($p > 0.05$).



А



Б

Рис. 3 Общее количество клеток костного мозга в 1 бедренной кости крыс, облученных фракционированно в суммарных дозах 1,5 (А) и 3,0 Гр (Б) после курсового введения зоотоксинов

Примечания: статистически значимые отличия: * – $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; # – $p < 0.05$ по отношению к группе контроль (облучение); + – $p < 0.05$ по отношению к контролю.

Вероятно, отсутствие протекторного действия на кроветворные клетки в условиях длительного ионизирующего облучения радиации при использовании яда саламандры связано с недостаточной мощностью защитных систем, индуцированных введением этого зоотоксина.

Фракционированное γ -облучение в суммарной дозе 1,5 Гр не оказывало влияния на митотическую активность клеток костного мозга. При облучении в суммарной дозе 3,0 Гр у контрольных животных наблюдалось снижение

уровня пролиферации кроветворных клеток в среднем на 30 % по отношению к интактным животным ($p < 0.05$). Яды пчелы, жабы и саламандры статистически значимо увеличивали митотический индекс по сравнению с контрольными группами крыс ($p < 0.05$).

Таким образом, исследуемые зоотоксины, сохраняя на должном уровне процессы пролиферации в кроветворной ткани костного мозга, будут способствовать восстановлению гемопоэза, увеличивая скорость восполнения погибших кроветворных клеток.

Цитогенетический анализ клеток костного мозга показал, что фракционированное облучение в суммарной дозе 1,5 Гр увеличивало процент абберрантных метафаз в среднем в 4 раза в группе «контроль на облучение» по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$).

При облучении в суммарной дозе 1,5 Гр в опытных и контрольных группах животных не было обнаружено статистически значимых отличий по отношению к интактным животным и к группе «контроль на облучение» ($p > 0.05$). При введении яда пчелы наблюдалась тенденция к снижению содержания абберрантных метафаз в костном мозге по отношению к группе контроль (облучение) ($0.05 < p < 0.1$).

В условиях фракционированного облучения в суммарной дозе 3,0 Гр наблюдалось увеличение частоты хромосомных aberrаций приблизительно в 6 раз по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$) (табл. 5). В группах лабораторных животных, которым вводили яды пчелы, жабы и саламандры наблюдалось снижение уровня хромосомных aberrаций по отношению к «контролю на облучение» ($p < 0.05$) (табл. 5). Подобный эффект был отмечен и при введении животным растворителей этих зоотоксинов: физиологического раствора и 12 % этанола, что свидетельствует о неспецифическом механизме данного явления.

**Частота хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс,
облученных фракционировано в суммарной дозе 3,0 Гр после курсового
введения зоотоксинов**

Группы животных	Общее количество клеток	Аберрантные клетки, %
Интактные	253	1,2 ± 0,7
Контроль (облучение)	362	6,9 ± 1,3*
Контроль для пчелиного яда (физ. р-р)	277	1,4 ± 0,7 [#]
Яд пчелы (0,1 мг/кг)	658	2,1 ± 0,8 [#]
Контроль для ядов саламандры и жабы (12 % этанол)	333	1,8 ± 0,5 [#]
Яд жабы (0,1 мг/кг)	309	1,0 ± 0,6 [#]
Яд саламандры (0,5 мг/кг)	99	1,6 ± 0,7 [#]

Примечания: статистически значимые отличия: * – $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; [#] – $p < 0.05$ по отношению к группе контроль (облучение).

Исследование интенсивности процессов ПОЛ в крови крыс на следующие сутки после окончания фракционированного облучения в суммарной дозе 1,5 Гр и суммарной дозе 3,0 Гр не показало увеличения уровня МДА. Предварительное введение крысам ядов жабы и саламандры снижало концентрацию МДА в крови животных при фракционированном облучении в суммарной дозе 3,0 Гр по отношению к интактным и контрольным группам ($p < 0.05$).

На основании полученных результатов можно заключить, что при профилактическом курсовом введении крысам малых доз ядов пчелы, жабы и саламандры развивается состояние радиорезистентности, позволяющее эффективно защищать систему красного костного мозга в условиях однократного γ -облучения в дозах 1,5 и 3,0 Гр. Состояние

радиорезистентности является длительным и позволяет успешно защищать кроветворную ткань костного мозга и генетический материал клеток от воздействия фракционированного γ -облучения. Радиозащитное действие зоотоксинов обусловлено их способностью повышать устойчивость кроветворных клеток, снижать уровень ингибирования их пролиферативной активности и интенсивность свободнорадикальных процессов.

Результаты исследования подтверждают адаптогенные свойства малых доз зоотоксинов и предполагают возможность создания на их основе препаратов, повышающих резистентность организма при воздействии ионизирующей радиации в дозах, вызывающих костномозговую форму лучевой болезни, а также в условиях длительного облучения.

ВЫВОДЫ

1. Курсовое введение крысам ядов пчелы (0,1 мг/кг), жабы (0,1 мг/кг) и саламандры (0,5 мг/кг) в условиях относительной нормы снижало активность свободнорадикальных процессов; не оказывало мутагенного действия; ингибировало (за исключением яда жабы) митотическую активность кроветворных клеток лабораторных животных.

2. Многократное введение малых доз зоотоксинов оказывало радиозащитный эффект на систему красного костного мозга лабораторных животных в условиях общего однократного γ -облучения в дозах 1,5 и 3,0 Гр, о чем свидетельствовало статистически значимое по сравнению с контрольными животными:

- а) увеличение количества выживших кроветворных клеток красного костного мозга;
- б) снижение уровня ингибирования митотической активности кроветворных клеток у животных, которым вводили яды пчелы и саламандры.

3. Яды пчелы, жабы и саламандры оказывали радиопротекторное действие в условиях фракционированного γ -облучения в суммарных дозах

1,5 и 3,0 Гр, статистически значимо увеличивая, по сравнению с контрольными животными, количество выживших клеток красного костного мозга (за исключением яда саламандры) и уровень их пролиферативной активности.

4. Профилактическое курсовое введение малых доз ядов пчелы, жабы и саламандры оказывало защитное действие на генетический материал клеток костного мозга в условиях фракционированного облучения, снижая уровень хромосомных аберраций по отношению к группе контроль (облучение).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Корягин А.С. Продолжительность радиорезистентности системы крови крыс, возникающей при многократном введении малых доз некоторых зоотоксинов / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.Н. Гамова**, О.Ю. Ванеева // Фундаментальные и прикладные исследования в системе образования. Материалы III Междунар. научн.-практ. конф. Тамбов: Першина.–2005. – С. 93–95.

2. Корягин А.С. Повышение устойчивости популяции лабораторных крыс к повреждающему действию фракционного гамма-облучения с помощью многократного введения животных ядов в нетоксических дозах / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.Н. Гамова** // Популяции в пространстве и времени. Сборник материалов VIII Всероссийского популяционного семинара. Нижний Новгород. – 2005. – С. 167–169.

3. Корягин А.С. Использование нетоксических доз ядов саламандры и жабы для защиты от фракционного гамма-излучения / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.Н. Гамова**, В.В. Логинов, О.Ю. Ванеева // Естествознание и гуманизм. Сборник научных работ. Томск: Изд-во сибирского мед. ун-та. – 2005. – Т. 2.– № 2. – С. 8–9.

4. Корягин А.С. Сравнительная оценка противолучевых свойств животных ядов по состоянию системы крови в условиях многократного гамма-облучения / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, В.Н. Якимов, В.В. Логинов,

О.Н. Гамова // Поволжский экологический журнал. – 2005. – № 2. – С. 137–146.

5. **Gamova O.N.** The use of nontoxic doses of bee venom for protection from fractional gamma-radiation / O.N. Gamova, A.S. Korjagin, E.A. Yerofeeveva, O.U. Vaneeva // Proceedings 3rd European Congress on Social Insects. St. Petersburg, Russia. –2005. – P. 140.

6. Корягин А.С. Исследование продолжительности состояния радиорезистентности кроветворной ткани костного мозга крыс, вызываемого действием зоотоксинов / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.Н. Гамова**, О.Ю. Ванеева // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия биология. – 2005. – Вып. 2(10). – С. 145–152.

7. Корягин А.С. Яды жабы зеленой (*Bufo viridis*) и саламандры пятнистой (*Salamandra salamandra*) как радиопротекторы длительного действия / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.Н. Гамова**, А.Д. Синельщиков, О.Ю. Ванеева // Актуальные проблемы герпетологии и токсинологии: Сб. науч. тр. – Вып. 8.–Тольятти. – 2005. – С. 67–74.

8. **Гамова О.Н.** Оценка антимуtagenных свойств саламандры пятнистой *Salamandra salamandra* при фракционном гамма-облучении / О.Н. Гамова // Тез. докл. 10-й Международной Пущинской школы – конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. – 2006. – С. 132.

9. Korjagin A.S. Venoms of the bee, salamander and toad as adaptogens of long action to extreme factors (on the example of ionizing radiation) / A.S. Korjagin, E.A. Yerofeeveva, **O.N. Gamova**, E.V. Kuznetsov, V.S. Suhov // Proceedings of the VIII World Congress «International society for adaptive medicine (ISAM)». Moscow, Russia. – 2006. – P. 191.

10. Корягин А.С. Сравнительный анализ противолучевых свойств ядов пчелы, саламандры и жабы в условиях однократного гамма-облучения / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.Н. Гамова**, Е.В. Кузнецов // Естествознание и гуманизм. Сборник научных работ. Томск. – 2006. – Т. 3. – № 1. – С. 60–61.

11. **Гамова О.Н.** Сравнительная оценка радиопротекторного действия некоторых зоотоксинов на систему кроветворения при однократном и фракционном γ -облучении / О.Н. Гамова, Е.В. Кузнецов // Тез. докл. 11-ой Нижегородской сессии молодых ученых (естественнонаучные дисциплины). Нижний Новгород. – 2006.– С. 177.

12. Корягин А.С. Экспериментальный и теоретический анализ адаптогенного действия ядов пчелы, саламандры и жабы в условиях фракционированного гамма-облучения / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.Н. Гамова**, В.С. Сухов // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия биология. – 2006. – Вып. 1(11). – С. 166–169.

13. Корягин А.С. Радиозащитные свойства пчелиного яда при многократном действии гамма-излучения в низких дозах / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, **О.Н. Гамова**, Е.В. Кузнецов // Материалы XII Всероссийской научн.-практ. конференции «Апитерапия сегодня». Рыбное: НИИ пчеловодства РАСХН.–2006. – Сб. 12. – С. 75–79.