

- pulmonary radiation fibrosis // Radiology.— 1977.— Vol.122.— P.389—397.
19. Ross R. Interpreting Exercise Tests.— Houston: CSI Software, 1989.
20. Rubin P., Casarett G.W. Respiratory system // Clinical Irradiation Pathology.— Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1968.— Vol.1.— P.423—470.
21. Sanders C.L., Lauhala K.E., McDonald K.E. Quantitative scanning electron microscopic autoradiography of inhaled  $^{239}\text{PuO}_2$  // Health Phys. [G2H].— 1989.— Vol.56, N 3.— P.321—325.
22. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor): recommendations in a standard technique // Am. Rev. Respir. Dis.— 1987.— Vol.236— P.1299—1307.
23. Tyler A.F., Blackman J.R. Effect of heavy radiation on pleura and lungs // J. Radiol.— 1922.— Vol.3.— P.469.
24. Wasserman K., Hansen J.E., Sue D.Y., Whipp B.J. Principles of Exercise Testing and Interpretation.— Philadelphia: Lea Febiger, 1987.
25. Watson A., Joyce H., Hopper L., Pride N.B. Influence of smoking habits on change in carbon monoxide transfer factor over 10 years in middle aged men // Thorax.— 1993.— Vol.48.— P.119—124.

Поступила 06.12.93

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616—001.28—07:[616.233—008.8+616.155.3]—073

*А.В.Бизюкин, Б.Х.Ягмуров, А.А.Тимофеев, С.К.Соодаева*

## СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ НА ОТДАЛЕННЫХ СРОКАХ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

### FREE RADICAL PROCESSES AS DISTANT RESULTS OF IRRADIATION

*A.V.Bizyukin, B.H.Yagmurov, A.A.Timofeev, S.K.Soodaeva*

#### S u m m a r y

Free radical status of 9 liquidators of Chernobyl catastrophe consequences was investigated. The level of lipid peroxidation, extra- and intracellular ratio of oxygen active form (OAF) and concentration of calcium ions in the phagocytes in the bronchoalveolar lavage (BAL) and blood were studied. It was found that the above parameters in the blood cells are the same as in those of the healthy people. But the greater formation rate of active radicals in the BAL cells and increased content of lipid peroxidation products and calcium ions was witnessed. According to the data obtained, the activation of free radical processes in the examined patients lungs may be interpreted as the distant results of aerosol radiation damage. Different possible approaches to the treatment of Chernobyl catastrophe liquidators are discussed.

#### Р е з ю м е

Исучен свободнорадикальный статус 9 пациентов—ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС. Измерены следующие параметры: уровень перекисного окисления липидов, соотношение вне- и внутриклеточной продукции активных форм кислорода и концентрация ионов кальция в фагоцитирующих клетках бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и крови.

Получены данные о том, что исследованные параметры не отличаются от нормальных в клетках крови. В то же время в клетках БАЛ было зарегистрировано усиление внутриклеточной продукции активных форм кислорода, увеличение содержания продуктов ПОЛ и ионов кальция.

Представленные результаты позволяют интерпретировать активацию свободнорадикальных процессов в легких обследованных пациентов именно как отдаленный результат аэрозольного радиационного воздействия. Обсуждаются возможные подходы к лечению пациентов—ликвидаторов радиационных аварий.

Одним из основных патогенетических факторов развития радиационного поражения является интенсификация свободнорадикальных процессов (СРП) в организме [1]. Усиление этих процессов в тканях в ответ на радиационное воздействие происходит сразу после облучения и в основном при больших дозах радиации (свыше 2—3 Гр) [4]. Малые же дозы радиации (до 1 Гр) [6] в эксперименте на животных не вызывают резкого роста уровня СРП [10]. Течение этих реакций может иметь длительный латентный период с последующим прогрессированием. Но некоторые показатели СРП могут повышаться непосредственно при радиационном воздействии. Фагоцитирующие

клетки легких и крови также являются источниками свободных радикалов и могут играть ведущую роль в развитии СРП в организме [7]. Различные репарационные системы организма могут угнетаться или активироваться в зависимости от дозы облучения и от сроков после воздействия радиации [6]. Однако свободнорадикальный статус пациентов при отдаленных сроках воздействия малых доз радиации изучен недостаточно. Известны данные об усилении внутриклеточной продукции активных форм кислорода (АКФ) при действии малых доз радиации, что приводит к повреждению ДНК в ранние сроки лучевого поражения [14]. К сожалению, авторы пользовались не прямым методом измерения

продукции АФК. В нашей лаборатории разработан новый прямой метод регистрации вне- и внутриклеточной генерации АФК, позволяющий исследовать тонкие механизмы окислительного метаболизма фагоцитов как в норме, так и при различных патологических состояниях, в том числе и при радиационном поражении.

Увеличенная внутриклеточная продукция АФК обнаружена при выраженных формах наследственных гемоглинопатий [13]. При отсутствии в анамнезе указанных патологий внутриклеточная продукция радикалов, возможно, связана с радиационным воздействием.

Изменение окислительного метаболизма фагоцитов непосредственно связано с функционированием многих ферментных систем клетки, в регуляции которых важную роль играют ионы  $Ca^{2+}$ . Было показано, что в острый период (1 сут.) после облучения крыс малыми дозами радиации концентрация цитозольного кальция возрастала в 4 раза и через трое суток возвращалась к первоначальным значениям. Однако в этот период могут появляться клоны гиперактивных клеток с высоким содержанием  $Ca^{2+}$  [5]. В отдаленный период после облучения, когда наблюдается угнетение клеток, следовало бы ожидать уменьшения и внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  или сохранения исходных значений.

В экспериментах на животных воздействие радиации приводит к увеличению пероксидации липидов в плазме крови. Этот эффект сохраняется в течение длительного времени [2]. Оценка образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — это важный информативный параметр, отражающий уровень радиационного поражения.

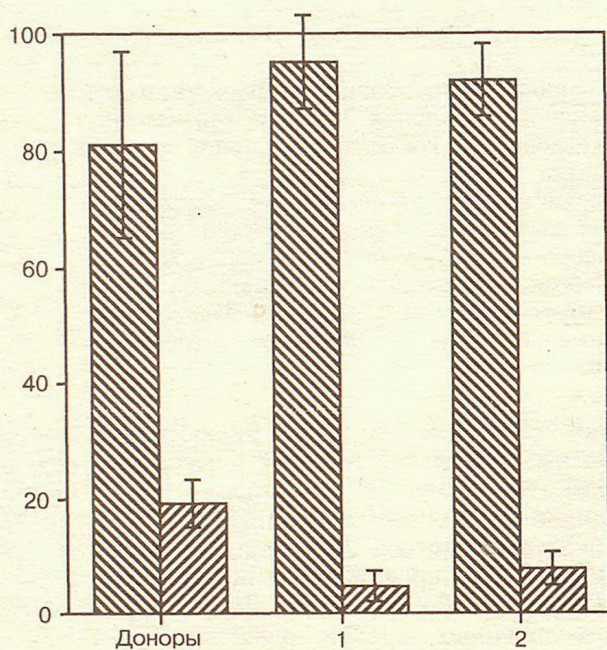


Рис. 1. Вне- и внутриклеточная продукция АФК в клетках лейкоцитарной крови обследованных пациентов.

Здесь и далее по оси ординат отложены значения интенсивности АФК в процентах от суммарной. Черные колонки — внеклеточная продукция АФК; заштрихованные — внутриклеточная продукция АФК.

Целью настоящей работы явилось исследование окислительного метаболизма фагоцитов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и крови, соотношения вне- и внутриклеточной продукции АФК, содержания  $Ca^{2+}$  и продуктов ПОЛ в крови и БАЛ у пациентов с заболеваниями бронхолегочной системы — ликвидаторов радиационных аварий.

БАЛ исследовали в связи с аэрозольными поражениями органов дыхания, а периферическую кровь — для оценки общей реакции организма на радиационное воздействие.

Проведено обследование 9 мужчин в возрасте 35—55 лет, в разное время принимавших участие в ликвидации аварии на ЧАЭС. Исследования проводились на лейкомасте и плазме периферической крови, а также на клетках и супернатанте БАЛ, полученных с применением общепринятых методик [9,10,12]. Содержание альвеолярных макрофагов в БАЛ 70—90%. Соотношение вне- и внутриклеточной генерации АФК в фагоцитах изучали с помощью витального флюорохрома — гидроэтидина (ГЭ). Принцип метода основан на способности данного красителя накапливаться внутри клеток и после взаимодействия с АФК превращаться в этидиум, изменяя при этом свои люминесцентные свойства.

Для измерения внутриклеточной продукции АФК суспензию клеток в растворе Хенкса (рН=7,4) инкубировали с  $10^{-4}$  М ГЭ [16,17], тщательно отмывали центрифугированием (5 минут при 800 g и  $+4^{\circ}C$ ) в избытке раствора Хенкса и окончательно ресуспендировали до концентрации  $10^6$  кл/мл. Интенсивность продукции АФК определяли по образованию этидиума из ГЭ в клетках, регистрируя интенсивность флюоресценции этидиума при длинах волн эмиссии — 610 нм и экстинции — 473 нм на спектрофлуориметре MPF-44 (Perkin—Elmer) в сантиметровых кварцевых кюветках, при  $37^{\circ}C$  и постоянном перемешивании.

Для сравнения вне- и внутриклеточной продукции АФК готовили две пробы клеток. Первая — нагруженные ГЭ фагоциты тщательно отмывали от избытка флюоресцентного красителя и затем стимулировали форболмирилатацетатом (ФМА). Таким образом определяли только внутриклеточную генерацию АФК. Вторая проба содержала нагруженные ГЭ, не отмывые от избытка красителя клетки. Их активировали такой же концентрацией ФМА. При этом измеряли как внутри-, так и внеклеточную (т.е. суммарную) продукцию кислородных радикалов. Величину внеклеточной продукции АФК получали вычитая из величины суммарной продукции величину внутриклеточной продукции радикалов. Уровень ПОЛ определяли по образованию малонового диальдегида (МДА) [10], концентрацию  $Ca^{2+}$  — комплексометрическим методом с использованием набора реактивов BIOTEST—LACHEMA фирмы «СНЕМАРОЛ» (Чехословакия).

Изменение СРП в организме может быть следствием не только радиационного воздействия, но и результатом развития воспалительных процессов [3,15]. Чтобы дифференцировать изменение показателей СРП, вызванных воспалением, от обусловленных воздействием радиации, пациенты были разделены на две группы. В 1-ю группу были включены пациенты, у которых, согласно

Т а б л и ц а 1

Состояния ПОЛ и содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в крови у обследованных пациентов

Пациенты	МДА в плазме, нмоль/мл	$\text{Ca}^{2+}$ в плазме, Мм	МДА в лейкоmasсе, нмоль/ $10^6$ кл.
Доноры	$6,5 \pm 1,5$	$2,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2$
1-я группа	$7,8 \pm 0,7$	$2,02 \pm 0,2$	$0,71 \pm 0,1$
2-я группа	$6,5 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,3$	$0,55 \pm 0,17$

истории болезни, незадолго до начала исследования наблюдалось обострение бронхолегочного заболевания (4 человека), во 2-ю — больные в стадии ремиссии (5 человек).

Измерение продукции АФК в клетках лейкоmasсы крови показало, что внутриклеточная продукция в обеих группах пациентов снижена, по сравнению с донорами (рис.1). Это, по-видимому, связано с ослаблением неспецифического иммунитета. В то же время внеклеточная генерация радикалов в 1-й, во 2-й группах и у доноров достоверно не отличаются.

Не обнаружено изменений и при исследовании перекисидации липидов мембран клеток лейкоmasсы крови (табл.1). Содержание МДА было в пределах нормальных значений. Уровень ПОЛ и содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в плазме крови также не отличались от контрольных значений (см. табл.1). Из таблицы видно, что существенных изменений исследованных показателей СРП в периферической крови не выявлено.

Иные данные получены при исследовании СРП в БАЛ пациентов. В супернатанте БАЛ 1-й группы пациентов выявлено увеличение уровня МДА (табл.2). У пациентов этой же группы наблюдается тенденция к повышению концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Эти изменения, по-видимому, связаны с остаточным воспалением, которое могло стать причиной повреждения структуры клеточных мембран, возможно, разрушения  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, денатурации  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков и, следовательно, накопления  $\text{Ca}^{2+}$  в супернатанте БАЛ [8,15].

Наиболее интересные результаты получены при изучении фагоцитов БАЛ пациентов. У обеих групп пациентов уровень перекисидации липидов оказался повышен приблизительно в два раза по сравнению с донорами. Концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в альвеолярных макрофагах у пациентов 1-й и 2-й групп также увеличена по сравнению с нормой (см. табл.2).

При измерении внеклеточной продукции АФК

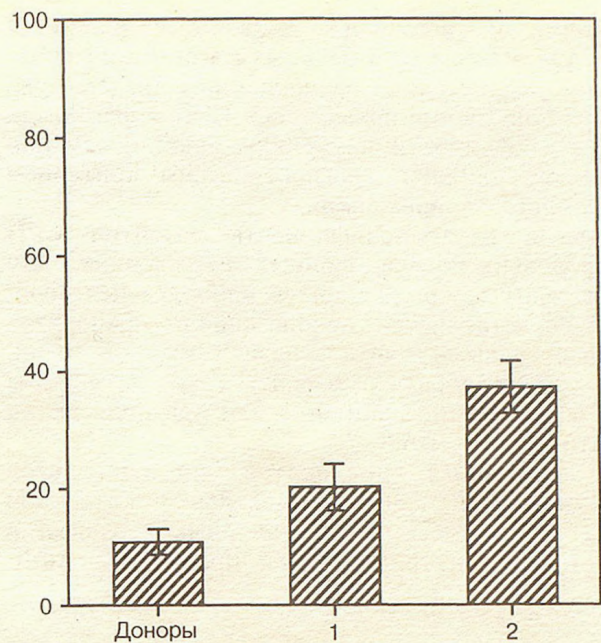


Рис. 2. Внутриклеточная продукция АФК в клетках БАЛ обследованных пациентов.

клеток БАЛ не было выявлено достоверных отличий у всех обследованных пациентов. Однако внутриклеточная генерация АФК у пациентов 1-й группы была почти вдвое, а у пациентов 2-й группы более чем в три раза выше, чем в клетках доноров (рис.2). Усиление внутриклеточной продукции АФК фагоцитами БАЛ больных независимо от стадии заболевания (ремиссия или обострение) является, вероятно, показателем нарушения окислительного метаболизма, вызванного радиационным поражением. Как уже упоминалось ранее [14], было обнаружено увеличение внутриклеточной генерации АФК при остром радиационном воздействии. Из представленных нами результатов видно, что продукция АФК остается повышенной и в отдаленные сроки после радиационного воздействия. Интересно отметить, что это увеличение зарегистрировано только в клетках БАЛ.

Таким образом, при аэрозольных поражениях органов дыхания на отдаленных сроках воздействия радиоактивных веществ наиболее значимые изменения СРП обнаружены при исследовании фагоцитов БАЛ пациентов. Зарегистрировано увеличение внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , повышение внутриклеточной продукции радикалов, усиление ПОЛ. Изменения этих параметров не зависят от стадии обострения или ремиссии бронхолегочного

Т а б л и ц а 2

Состояние ПОЛ и содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в БАЛ у обследованных пациентов

Пациенты	Супернатант БАЛ		Клетки БАЛ	
	МДА, нмоль/мл	$\text{Ca}^{2+}$ , Мм	МДА, нмоль/ $10^6$ кл	$\text{Ca}^{2+}$ , Мкм/ $10^6$ кл
Доноры	$2,0 \pm 1,0$	$0,65 \pm 0,15$	$0,6 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,05$
1-я группа	$4,7 \pm 0,7$	$0,82 \pm 0,11$	$1,0 \pm 0,11$	$0,18 \pm 0,01$
2-я группа	$1,1 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,11$	$0,21 \pm 0,03$

заболевания и, возможно, связаны с влиянием единого для обеих групп больных патогенетического фактора — аэрозольного радиационного воздействия. При этом повышение показателей СРП в фагоцитах БАЛ и в особенности внутриклеточной продукции АФК может служить диагностическим критерием радиационного повреждения.

Учитывая местоспецифичность развития СРП при аэрозольных радиационных поражениях, для лечения таких групп пациентов наиболее целесообразным представляется использование препаратов с антирадикальными и антиоксидантными свойствами. Причем целесообразно вводить эти препараты именно в легкие, ингаляционно или при проведении диагностического БАЛ.

Для скрининга препаратов представляется перспективным в качестве модельной клеточной системы использование альвеолярных макрофагов с повышенной внутриклеточной продукцией АФК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Верхогляд И.Н., Цудзевич Б.А.* // Радиобиология.— 1992.— Т.32, N 3.— С.412—417.
2. *Гацко Г.Г., Мажуль Л.М., Шаблинская О.В., Вольхина В.Е.* // Всесоюзный радиобиологический съезд, 1-й: Тезисы докладов.— М., 1989.— Т.1.— С.59—60.
3. *Ким Л.Б., Матаев Р.Н., Русакова Э.С., Куликов В.Ю.* // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР.— 1989.— N 1.— С.66—70.
4. *Ормоцадзе Г.Л.* // Радиационное исследование.— 1989.— N 5.— С.5—17.
5. *Ручко М.В., Славинская Е.А., Матышевская О.П., Кучеренко Н.Е.* // Укр. биох. журн.— 1990.— Т.62, N 47.— С.110—113.
6. *Спитковский Д.М.* // Радиобиология.— 1992.— Т.32, N 3.— С.382—400.
7. *Жербин Е.А., Чухловин А.Б., Ващенко В.И.* // Мед. радиол.— 1988.— Т.33, N 11.— С.46—51.
8. *Шевченко А.С., Шевченко Т.С., Пантелеев Л.И.* // Всесоюзный радиобиологический съезд, 1-й: Тезисы докладов.— М., 1989.— Т.5.— С.1228—1229.
9. *Asakawa T., Matsushita S.* // Lipids.— 1980.— Vol.15, N 3.— P.137—140.
10. *Bahgat Hervat M.* // J. Egypt. Med. Ass.— 1987.— Vol.70, N 5—8.— P.393—400.
11. *Berhard D.E., Fisher B.J., Kessler F.K., Carchman R.A., Fowler A.A.* // J. Clin. Lab. Immunol.— 1988.— Vol.26.— P.67—71.
12. *Boyum A.* // Scand. J. Clin. Lab. Invest.— 1968.— Suppl.97.— P.77.
13. *de Martino M., Rossi M.E., Resti M., Vullo C., Virucci A.* // Acta Haemat.— 1984.— Vol.71.— P.289—298.
14. *Felndendegen L.E., Muhlensiepen H., Bond V.P., Sondhaus C.A.* // Health Phys.— 1987.— Vol.52, N 5.— P.663—669.
15. *Nozul Mutsumi, Ogata Takesaburo* // Exp. Med. Pathol.— 1989.— Vol.50, N 2.— P.252.
16. *Kobzik L., Godleski J., Brain J.* // J. Leukocyt. Biol.— 1990.— Vol.47, N 4.— P.295—303.
17. *Rothe G., Oser A., Valet G.* // Naturwissenschaften.— 1988.— Bd 75.— S.354—355.

Поступила 03.11.93

© КОСЕНКО М.М., 1993

УДК 616—001.28—07:616.2—07

*М.М.Косенко*

## АНАЛИЗ ПАТОЛОГИИ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ У НАСЕЛЕНИЯ, ОБЛУЧИВШЕГОСЯ НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск

### THE ANALYSIS OF PULMONARY DISEASES AMONG THE POPULATION, EXPOSED TO IRRADIATION IN THE SOUTH URAL

*Kosenko M.M.*

#### С у м м а р у

The results of epidemiological analysis of mortality from pulmonary diseases and lung cancer among the population, exposed to radiation in the region of South Ural, are presented. These groups of patients include the persons exposed to radiation due to in 1957 accident and after the radiation products contamination of the Techa river. The dose of radiation equal to 0,2—127 cZv hasn't changed the mortality from pulmonary diseases and lung cancer in this group of patients. But there is a tendency in the morbidity of bronchial asthma among population living on the territory, concomitated by radiation to increase. The investigation must be followed by the analysis of morbidity and pulmonary function tests.

#### Р е з ю м е

Представлены результаты эпидемиологического анализа смертности от болезней органов дыхания, а также от рака легких среди лиц, облучившихся на Южном Урале: у населения, подвергнувшегося радиационному воздействию в связи со сбросом радиоактивных отходов в реку Теча, и у людей, облучившихся при радиационной аварии 1957 года. Радиационное воздействие в дозах от 0,2 до 127 сЗв на легкие не изменило общих закономерностей смертности от болезней органов дыхания и злокачественных новообразований легких, однако была установлена тенденция к увеличению заболеваемости бронхиальной астмой у населения, живущего на территориях, загрязненных радиоактивными веществами. Исследование патологии органов дыхания у лиц, облучившихся на Южном Урале, должно быть продолжено с использованием анализа заболеваемости и данных функциональных легочных тестов.