

Н. М. ОГАНЕСЯН

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ВНУТРЕННЕМ ОБЛУЧЕНИИ ИЗОТОПОМ СЕРЫ-35

Сообщение первое

В последние годы в различных областях науки и техники, в исследовании разнообразных проблем биологии и медицины широкое распространение получил люминесцентно-микроскопический метод исследования.

Так как одной из существенных задач радиобиологии является детальное изучение ранних изменений, наступающих тотчас или вскоре после облучения радиоактивными веществами, то, естественно, что люминесцентный метод исследования получил самое широкое применение и в этой области медицины, в частности при гематологических исследованиях. Незначительные повреждения клеточных элементов крови, возникающие после несмертельных для животного облучений, обычными гематологическими методами выявляются далеко не всегда, а результаты их часто не убедительны.

Гораздо проще, быстрее и отчетливее ранние структурные изменения в крови выявляются при помощи люминесцентной микроскопии. М. Н. Мейсель, В. А. Сондак [1], М. Я. Ходас [2], И. Г. Красных [5] и др. изучали возможность применения весьма тонких методов люминесцентной микроскопии для выявления изменений и сдвигов, наступающих в костном мозгу и периферической крови облученных животных. При этом они показали, что уже вскоре после облучения удается установить признаки нарушения в структурах и функциях костного мозга и, несколько позже, в периферической крови (микронекрозы Мейселя).

Сущность люминесцентной микроскопии заключается в том, что под влиянием сине-фиолетового света ткани, предварительно обработанные специальными красителями (флюорохромы), светятся различными цветами.

В основе ранних лучевых поражений особенно чувствительных тканей лежат нарушения в состоянии и обмене нуклеиновых кислот, которые, как известно, являются важнейшими компонентами живых клеток и тканей. Они входят в состав ядерных и протоплазматических структур клеток и участвуют в синтезе белка и нуклеопротеидов, в образовании ферментов, в накоплении и распределении энергии. Они принимают непосредственное участие в делении ядер и клеток. Флюорохромы обладают сродством с нуклеопротеидами и нуклеиновыми кислотами, прочно с ними связываются и придают им достаточно отчетливую люминес-

ценцию. Наилучшим из этих флюорохромов является акридиновый оранжевый краситель, который в одних и тех же концентрациях придает нуклеиновым кислотам дезоксирибозного ряда (ДНК) ярко-зеленое свечение, и рибозного ряда (РНК) — красное свечение. Эритроциты (зрелые) не люминесцируют, так как они заполнены гемоглобином. Молодые эритроциты светятся ярко-красным светом (сеточка), следовательно люминесценция дает возможность быстро и просто выявить молодые эритроциты с ретикулярной субстанцией — ретикулоциты. Кровяные пластинки люминесцируют желтовато-красным светом, их скопления хорошо различимы на фоне несветящихся эритроцитов.

Ядерные нуклеопротенды дегенерирующих клеток связываются с флюорохромами иначе, чем нуклеопротенды неповрежденных клеток что отражается на характере их свечения. Ядра лейкоцитов изменяют свечение с ярко-зеленого, на зеленовато-желтое, желтое и красное.

При окраске препаратов смесью акридин—оранжа с фуксином, можно проследить нарушения в обмене протоплазматических нуклеопротендов (РНК). Акридин-оранж, связываясь с РНК, образует комплексы, люминесцирующие ярко-красным. В протоплазме некоторых клеток, принадлежащих, видимо, к молодым клеткам миелобластической группы костного мозга, вскоре после облучения начинает усиленно накапливаться РНК, что сопровождается резким усилением красного свечения. Нуклеиновая кислота заполняет всю клетку, маскируя ее ядро. Клетки разбухают, округляются и превращаются в ярко-красные шаровидные образования. Через 2—3 ч. после облучения появляются скопления таких красных шаровидных образований (микронекрозов), отчетливо выделяющихся на фоне клеток крови, которые светятся преимущественно зеленым и желтовато-зеленым. По данным ряда авторов (Мейсель, Сондак [1], И. Н. Иванов [3]), микронекротические очаги при помощи люминесцентной микроскопии можно выявить уже через полчаса (а возможно и раньше) после облучения. Количество этих скоплений увеличивается и достигает максимума к 9—12 ч. и затем постепенно снижается к 24 ч. С увеличением дозы облучения количество микронекрозов возрастает.

В какой мере эти микронекрозы специфичны именно для лучевого поражения организма и не могут ли они возникать при других патологических состояниях? М. Н. Мейсель и др. экспериментально проследили это при кровопотерях, действии стафилококковых и дифтерийных токсинов. При этом типичных для лучевого поражения микронекрозов не было обнаружено.

В доступной литературе мы не нашли данных о токсикологии радиоактивной серы, в частности о ее влиянии на кроветворение. Мы изучали действие изотопа серы-35 на кроветворение животных. При этом, кроме обычных морфологических методов исследования крови, для регистрации самых ранних изменений в крови животных, мы применяли метод люминесцентной микроскопии. Данные, полученные нами, позволяют делать некоторые выводы относительно действия радиоактивной серы на кровь.

В качестве флюорохрома мы использовали акридин-оранж, а для тушения люминесценции—кислый фуксин—1—2 капли. Основной раствор акридин-оранжа готовился разведением краски дистиллированной водой 1 : 1000. Раствор готовили и сохраняли в темной пробирке. Рабочие растворы приготавливались один раз в неделю на свежем физиологическом растворе и сохранялись, как и исходный раствор. Исследуемая кровь смешивалась с флюорохромами в специальных стаканчиках (1,5 см высотой, приготовленных из пробирок для микроанализов), которые помещались во влажную камеру (чашки Петри). Кровь у крыс бралась из хвоста. Люминесцентные исследования проводились с помощью обычного микроскопа в синем свете. Источником освещения служил осветитель ОИ-18 с ртутно-кварцевой лампой сверхвысокого давления типа СВД—120 А. Для фильтрации света использовались светофильтры—СЗС-7, СЗС-14, и ФС-1. На окуляр микроскопа надевался желтый светофильтр—ЖС-18-1. Для смешивания кровь оставлялась с красителями на 20 мин., после чего капля смеси наносилась на предметное стекло и покрывалась покровным. В разных местах препарата при увеличении 400 сосчитывали 100 лейкоцитов. По окончании работы, предметные и покровные стекла отмывались дистиллированной водой и протирались насухо. Спирт и эфир для мытья стекла не использовались.

Изменение данных люминесцентной микроскопии периферической крови в зависимости от дозы однократного внутреннего введения серы-35, исследовалось на 4 группах крыс, по 10 животных в каждой. Все группы животных были одинаковыми как в весовом (средний вес группы—220—230 г), так и в половом, и возрастном отношениях. Животные однократно получали изотоп серы-35 в виде раствора $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ в следующих дозах: 1 группа—72 мкюри/кг, 2 группа—5 мкюри/кг и 3 группа—15 мкюри/кг, (4 группа—контроль). При выборе этих доз, мы исходили из следующего: для 1 группы мы взяли дозу—72 мкюри/кг, которая является годовой предельно-допустимой дозой для профессионального облучения. Так как эта доза не вызвала в организме животных каких-либо явных изменений, то было решено для острых опытов взять дозы в 50 (5 мкюри/кг) и в 150 (15 мкюри/кг) раз больше предельно-допустимых.

Кровь, обработанная вышеуказанным способом, исследовалась до затравки (фон), после затравки животных через полчаса, 1 ч., 3 ч., 5 ч., 24 ч., 5 суток, 10 суток и т. д. При этом, до затравки наблюдалось 96—100% ярко-зеленого свечения клеточных элементов и только единичные клетки были окрашены в желтые и оранжевые цвета, разной тональности. Лишь у одного животного было 92% клеток, светящихся зеленым светом.

Исследования показали, что при поступлении внутрь, изотоп серы-35 вызывает изменение свечения лейкоцитов—уменьшение количества клеток, окрашенных в зеленый цвет, и нарастание числа лейкоцитов, окрашенных в желтые, оранжевые и красные тона. Хотя эта однородная реакция наблюдалась во всех группах, но соответственно дозе облуче-

ния, эти изменения были выражены во 2 группе ярче, чем в 1, а в 3 группе ярче, чем во 2.

При обследовании крови животных 1 группы мы выявили следующее—через 30 мин. после облучения наблюдалась некоторая реакция со стороны люминесцентной картины, что проявлялось в основном в виде некоторой перегруппировки клеточных элементов (увеличение желтого свечения), но процент зеленых клеток падал незначительно—всего на 0,4%. Через час же количество зеленых элементов уже явно падало (93,8%) и это падение достигало максимума на 3 ч. после облучения (89,6%). При этом количество желто-оранжево-красных клеток пропорционально увеличивалось. После этого, с 5—10 ч. начиналось постепенное восстановление картины люминесценции и уже через 24 ч. положение почти достигало фоновых величин.

Обследованные в те же самые сроки 2 и 3 группы представляли несколько иное соотношение. После затравки животных уже через полчаса—час отмечалось резкое падение количества зеленых элементов и появление клеток, ядра которых люминесцируют от оранжевого до желтого цветов, количество их постепенно увеличивалось и достигало максимума на следующие сутки (10—12%). Через 1—3 ч. после получения животными изотопа среднее содержание зеленых клеток составляло 84,5% (2 г), кроме этого, наблюдалось появление в крови скоплений красных шаровидных образований (особенно в 3 группе). Количество этих скоплений изменялось соответственно оранжево-красно-люминесцирующим элементам. Наиболее выраженные изменения здесь наступали к 20—24 ч. Они были более глубоки и восстановление нормального соотношения элементов наступало гораздо позже. Минимальное содержание лейкоцитов, светящихся зеленым светом у отдельных животных (крыса № 2), составляло 48%, наибольшее количество лейкоцитов, светящихся красным светом, составляло 12% (крысы № 23, 156). Проведенные нами в те же сроки обычные морфологические исследования не обнаружили никаких изменений в крови, а регистрировали их гораздо позже, начиная со вторых суток. Данные по изменению люминесценции крови у животных под влиянием серы-35 приводятся в табл. 1, 2, 3, 4.

Согласно нашему предварительному заключению, дозы в 72 мккюри/кг, 5—15 мкюри/кг серы-35 вызывают некоторые сдвиги в периферической крови. Последние проявляются в измененной люминесценции, имеющей место, начиная с 30 мин. и до 5—10 суток после введения препарата.

Таким образом, полученные нами данные по этому вопросу полностью совпадают с данными, имеющимися в литературе относительно изменения люминесценции при облучении радиоактивными веществами. На основании наших исследований, можно сказать, что метод люминесцентной микроскопии является одним из очень чувствительных методов, позволяющих судить о самых ранних изменениях в организме, наступающих в результате его облучения.

Таблица 1
Динамическое наблюдение за люминесцентной картиной крови у крыс 1 группы
(72 мккюри/кг)

| Время от момента облучения | Процент окрашенных лейкоцитов | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|--------|-----------|---------|-------|
| | зеленых | желтых | оранжевых | красных | д. ф. |
| До облучения | 97,4 | 1,4 | 1,0 | 0,2 | — |
| После облучения через 30 мин. | 97,0 | 2,6 | 0,2 | 0,2 | — |
| • 1 час | 93,8 | 4,2 | 1,4 | 0,4 | 0,2 |
| • 3 • | 89,6 | 7,6 | 1,4 | 0,8 | 0,6 |
| • 5 • | 92,2 | 5,8 | 0,6 | 1,4 | — |
| • 24 • | 92,0 | 6,2 | 1,0 | 0,8 | — |
| • 5 суток | 95,4 | 3,0 | 1,0 | 0,6 | — |
| • 10 • | 95,8 | 2,6 | 1,0 | 0,6 | — |
| • 20 • | 97,8 | 1,6 | 0,4 | 0,2 | — |
| • 30 • | 98,0 | 1,6 | 0,4 | — | — |

Таблица 2
Динамическое наблюдение за люминесцентной картиной крови у крыс 2 группы
(5 мкюри/кг)

| Время от момента облучения | Процент окрашенных лейкоцитов | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|--------|-----------|---------|-------|
| | зеленых | желтых | оранжевых | красных | д. ф. |
| До облучения | 97,2 | 1,8 | 0,8 | 0,2 | — |
| После облучения через 30 мин. | 94,0 | 3,8 | 1,4 | 0,6 | 0,2 |
| • 1 час | 88,6 | 5,0 | 3,2 | 3,0 | 0,2 |
| • 3 • | 84,5 | 7,5 | 4,2 | 3,2 | 0,6 |
| • 5 • | 85,6 | 7,2 | 2,4 | 4,8 | — |
| • 24 • | 78,8 | 11,6 | 3,8 | 4,8 | 1,0 |
| • 5 суток | 84,8 | 8,6 | 2,8 | 3,8 | — |
| • 10 • | 94,0 | 3,2 | 1,4 | 1,4 | — |
| • 20 • | 97,6 | 2,0 | 0,4 | — | — |
| • 30 • | 98,2 | 1,8 | — | — | — |

Таблица 3
Динамическое наблюдение за люминесцентной картиной крови у крыс 3 группы
(15 мкюри/кг)

| Время от момента облучения | Процент окрашенных лейкоцитов | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|--------|-----------|---------|-------|
| | зеленых | желтых | оранжевых | красных | д. ф. |
| До облучения | 96,4 | 2,2 | 1,2 | 0,3 | — |
| После облучения через 30 мин. | 91,8 | 4,8 | 2,0 | 1,2 | 0,2 |
| • 1 час | 92,2 | 5,6 | 1,0 | 1,0 | 0,2 |
| • 3 • | 87,8 | 6,4 | 3,8 | 1,8 | 0,2 |
| • 5 • | 83,1 | 8,4 | 4,1 | 3,2 | 1,2 |
| • 24 • | 67,8 | 16,4 | 6,2 | 8,6 | 1,0 |
| • 5 суток | 88,6 | 6,8 | 2,8 | 1,8 | — |
| • 10 • | 94,2 | 4,6 | 0,8 | 0,4 | — |
| • 20 • | 97,0 | 2,4 | 0,4 | 0,2 | — |
| • 30 • | 97,4 | 2,2 | 0,4 | — | — |

Таблица 4

Динамическое наблюдение за люминесцентной картиной крови у крыс
контрольной группы

| Дата | Процент окрашенных лейкоцитов | | | | |
|-------------|-------------------------------|--------|-----------|---------|-------|
| | зеленых | желтых | оранжевых | красных | д. ф. |
| 12.VI 1961 | 96.1 | 2.8 | 0.8 | 0.3 | -- |
| 25.VI 1961 | 95.9 | 3.1 | 0.8 | 0.2 | — |
| 10.VII 1961 | 97.4 | 1.4 | 1.0 | 0.2 | — |
| 22.VII 1961 | 97.2 | 2.2 | 0.6 | — | — |

*Изменение свечения ядер
лейкоцитов крови под влиянием
облучения серой-35.*

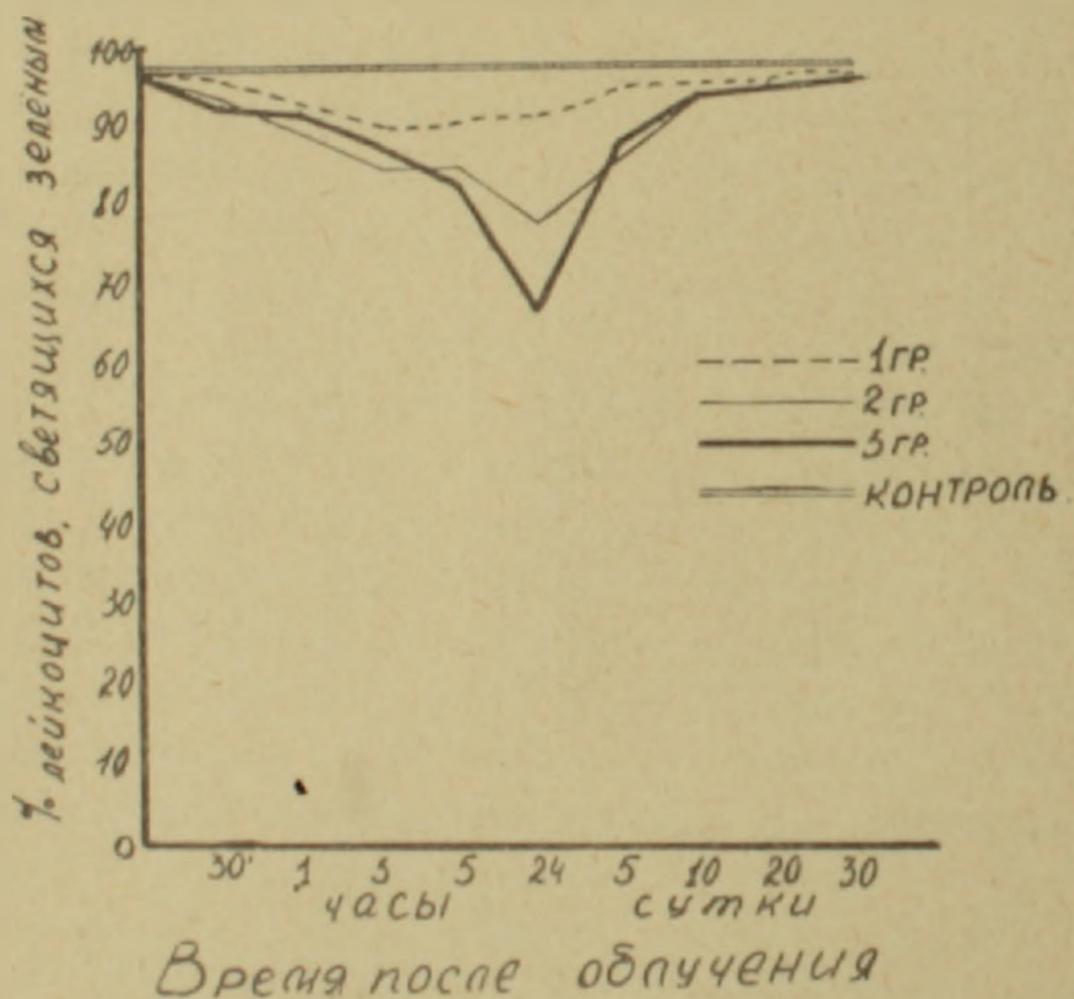


Рис. 1.

В ы в о д ы

1. При внутреннем облучении серой-35 в дозах 72 мккюри/кг, 5 и 15 мкюри/кг имеет место качественно однородная реакция—уменьшение количества лейкоцитов, светящихся зеленым светом, и нарастание числа клеток, окрашенных в желтые, оранжевые и красные тона.

2. Люминесцентная микроскопия крови может быть использована для ранней диагностики и оценки степени лучевого поражения в эксперименте.

Институт гигиены труда и профзаболеваний
Министерства здравоохранения АрмССР

Поступило 31.VII 1961 г

Ն. Մ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ՄԱՅՐԱՄԱՍՔԻՆ ԱՐՅԱՆ ԼՅՈՒՄԻՆԵՍԵՆՏԱՅԻՆ ՄԻԿՐՈՍԿՈՊԻԱՆ
ՄՇՈՒՄՔ-35-Ի ԻՋՈՏՈՊՈՎ ՆԵՐՔԻՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹԱՎՈՐՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Հաղորդում առաջին

Ա. մ. ֆ. ո. ֆ. ո. լ. մ.

Վերջին տարիներս գիտություն ու տեխնիկայի տարրեր բնագավառներում, կենսաբանության ու բժշկականության բազմազան պրոբլեմների ուսումնասիրություններում լայն տարածում է ստացել հետազոտության լյումինեսցենսամիկրոսկոպիական մեթոդը, որը փորձարարներին հնարավորություն է տալիս դատելու օրգանիզմում տեղի ունեցող այն բազմապիսի ամենափաղ փոփոխությունների մասին, որոնք առաջանում են օրգանիզմում ազդող զանազան անբարենպաստ գործոնների ազդեցությամբ:

Լյումինեսցենսային միկրոսկոպիայի էությունն այն է, որ հատուկ ներկի: ներով (ֆլյուորոֆորումներ) նախապես մշակված հյուսվածքները կապտա-մանուշակագույն լույսի ազդեցության տակ լուսավորվում են զանազան գույներով:

Մենք ուսումնասիրել ենք ծծումբ-35-ի իզոտոպի ներգործությունը կենդանիների արյունագոյացման վրա: Ընդամին, բացի արյան հետազոտության սովորական մորֆոլոգիական մեթոդներից, կենդանիների արյան մեջ կատարվող ամենափաղ փոփոխությունները պրանցելու համար, մենք կիրառել ենք լյումինեսցենսային միկրոսկոպիայի մեթոդը: Մեր ստացած տվյալները թույլ են տալիս արյան վրա ուղիղակիվ ծծմբի ներգործության վերաբերյալ որոշ եզրակացություններ անելու: Լյումինեսցենսային հետազոտությունները կատարվել են սովորական միկրոսկոպի միջոցով՝ կապույտ լույսի տակ:

Մեր նախնական եզրակացության համաձայն, ծծումբ-35-ի 72 մկկյուրի/կգ. 5—15 մկկյուրի/կգ զոզաները որոշ տեղաշարժեր են առաջացնում ծայրամասային արյան մեջ: Այդ տեղաշարժերը պրակտիկում են փոփոխված լյումինեսցենցիայում, որ տեղի է ունենում ճառագայթավորումից հետո, սկսած 30 րոպեից մինչև 5—10 օր:

Մեր ստացած տվյալները համընկնում են գրականության մեջ եղած տրված ալիներին: Մեր հետազոտությունների հիման վրա կարելի է ասել, որ լյումինեսցենսային միկրոսկոպիայի մեթոդը այն զգայուն մեթոդներից է, որոնք թույլ են տալիս դատելու օրգանիզմում տեղի ունեցող ամենափաղ փոփոխությունների մասին, որոնք կատարվում են ճառագայթավորման հետևանքով:

Եզրակացություններ

1. Ծծումբ-35-ի 72 մկկյուրի/կգ, 5—15 մկկյուրի/կգ զոզաներով, ներքին ճառագայթավորման դեպքում տեղի ունի որակապես համասեռ սեակցիա՝ կառույցի և կարմիր երանգներով ներկված բիջիջների թվի աճում:
2. Արյան լյումինեսցենսային միկրոսկոպիան կարող է օգտագործվել վաղ ախտորոշման և էքսպերիմենտում ճառագայթային ախտահարման ժանրության արժեքահատման համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мейсель М. Н., Сондак В. А. Журн. Биофизика, т. 1, вып. 3, 1960
2. Ходас М. Я. Журн. Мед. радиология, 3, т. 4, 1959.
3. Иванов И. Н. Тезисы докл. науч. конф. Воен.-мед. орд. Ленина акад. им. С. М. Кирова.
4. Берголец В. М. Люминесцентная микроскопия. Медгиз, 1953.
5. Красных И. Г. Журн. Мед. радиология, 3, т. 4, 1959.