

УДК 617—001.17—008.9

В. Е. МХЕЯН, Г. Г. ГАСПАРЯН

ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНЫХ ЛУЧЕЙ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН И СКОРОСТЬ СИНТЕЗА РНК В КОЖЕ У РЕНТГЕНОБЛУЧЕННЫХ КРЫС, ПОЛУЧИВШИХ ТЕРМИЧЕСКИЕ ОЖОГИ

Показано, что лучи лазера с длиной волны 6943 Å оказывают нормализующее действие на скорость транспорта ^3H -уридина в клетку и его включения в состав РНК у животных с ожоговой травмой. При радиационно-термическом поражении нормализующее влияние лазерных лучей проявляется в ранние сроки.

Проницаемость клеточных мембран для низкомолекулярных веществ изменяется при различных патологиях и экспериментальных воздействиях, так что исследование этого показателя может дать информацию о функциональном состоянии клеток и ткани в целом. Как известно, ионизирующее излучение поражает практически все функциональные структуры клеток, в том числе плазматическую мембрану. Так, показано [14] изменение проницаемости клеточных мембран культивируемых фибробластов китайского хомячка для ^3H -тимидина после облучения клеток рентгеновскими лучами в дозе 360 рад. Известно также, что облучение вызывает нарушение ряда метаболических процессов в клетке и среди них всех этапов обмена РНК [11, 12].

Сочетание рентгеновского облучения с термическим ожогом обладает значительно более глубоким поражающим действием на организм, чем каждый из этих факторов в отдельности [1, 9; 16]. Мы не обнаружили в литературе сведений об изменениях скорости транспорта веществ через клеточную мембрану и синтеза РНК в условиях радиационно-термического поражения, а также сведений о сдвигах этих показателей при ожоговой болезни.

В связи со сказанным и учитывая литературные и наши [3, 8] данные о благоприятном действии лазерных лучей на некоторые патологические процессы в организме, в частности, на течение термических ожогов [4], а также на радиорезистентность животных [6], мы в настоящем исследовании поставили цель изучить влияние монохроматических когерентных лучей на изменение проницаемости клеточных мембран для ^3H -уридина и скорости включения меченого предшественника в РНК у животных, подвергшихся рентгеновскому облучению и получивших термические ожоги.

Работа выполнена на 97 беспородных белых крысах массой 180—220 г. У животных удаляли волосы в области спины за 1—2 суток до начала опыта. Эксперименты проводили в следующих сериях. 1. Интактные животные (контроль). 2. Животные, получившие термический ожог (ожог). 3. Животные, получившие термический ожог и лазерные лучи (ожог+лазер). 4. Животные, облученные рентгеновскими лучами и получившие термический ожог (рентген+ожог). 5. Животные, облученные рентгеновскими лучами, получившие термический ожог и лазерные лучи (рентген+ожог+лазер).

Рентгеновское облучение проводили на аппарате РУМ-11 однократно, тотально, в дозе 600 р при следующих условиях: напряжение 200 кВ, сила тока 15 мА, кожно-фокусное расстояние 40 см, фильтры 0,5 Cu и 1 Al, мощность дозы 34 р/мин. Термический ожог 3-й степени наносили после рентгеновского облучения с помощью электропаяльника с терморегулятором типа РТП-2М. Лазерное облучение проводили на рубиновом лазере марки «Арзни-206» с длиной волны 6943 Å, мощностью 4 Дж/имп и частотой 2 Гц. Воздействие лазерными лучами осуществляли после нанесения ожога, а также через 1,3,7 суток после начала опыта в области ожоговой раны.

Распространенным количественным методом изучения скорости транспорта веществ в клетку является метод с применением радиоактивных изотопов. В случае, когда используются меченые предшественники макромолекул, этот метод позволяет при определенных условиях одновременно исследовать скорость синтетических процессов [7]. В наших опытах для определения скорости включения ^3H -уридина в клетку и в состав РНК у крыс брали биопсию кожи весом 60—100 мг поблизости от места нанесения ожога. Быстро очищали биопсию от подкожной клетчатки, взвешивали и погружали на 15 мин в раствор ^3H -уридина (удельной активностью 16,4 Кц/мМ) с конечной активностью 10 мКц/мл, приготовленный на физрастворе. Раствор изотопа предварительно подогревали до 37°, при той же температуре проводили инкубацию ткани. Предварительные определения радиоактивности ткани с варьированием времени ее инкубации с изотопом (5, 15, 30 и 60 мин) и активности изотопа (5, 10, 50 и 100 мКц/мл) показали, что избранные условия удовлетворительны для эффективного счета радиоактивности на сцинтилляционном счетчике. Затем кусочек кожи выдерживали 15 мин в двух сменах охлажденного до 4° физраствора. Показано [13], что такая обработка приводит к вымыванию свободного предшественника из межклеточных промежутков. Переносили кусочки ткани в охлажденный 5% раствор ТХУ (два раза по 15 мин, общий объем 6 мл). При подобной фиксации ткани происходит вымывание внутриклеточного пула ^3H -уридина, не включившегося в состав РНК (кислоторастворимая фракция), а в ткани сохраняется радиоактивность ^3H -уридина, включившегося в РНК (кислотонерастворимая фракция). Аликвоты ТХУ-экстракта наносили на кружки фильтровальной бумаги и подсушивали на воздухе. Пробы ткани солиоби-

лизировали и также наносили на фильтровальную бумагу. Приготовленные таким образом препараты помещали в кюветы для сцинтилляционного счетчика и определяли их радиоактивность на счетчике SL 30*. Полученные значения радиоактивности пересчитывали с учетом исходного веса ткани. Сумма радиоактивности кислоторастворимой и кислотонерастворимой фракций служила показателем скорости включения меченого уридина в клетку, а кислотонерастворимой фракции—скорости включения меченого предшественника в РНК.

Измерения проводили в динамике через 1,3,7,15 и 30 суток после начала опыта.

Результаты и обсуждение

Термический ожог сам по себе и в сочетании с рентгеновским облучением вызывает на 1-е сутки после воздействия сильное (до 335% в 4-й серии) возрастание проницаемости плазматической мембраны кле-

Таблица
Скорость включения ^3H -уридина в клетки и РНК

Сроки наблюдений, сутки	Включение ^3H -уридина в клетку, число распадов на единицу веса ткани	Включение ^3H -уридина в РНК, число распадов на единицу веса ткани
1-я серия (контроль)		
	7,23±0,6	2,25±0,3
2-я серия (ожог)		
1	22,19±4,5	2,66±0,5
3	34,88±6,1	4,32±1,0
7	20,39±3,3	2,40±0,3
15	7,75±1,1	1,85±0,3
30	8,37±0,9	3,10±0,9
3-я серия (ожог+лазер)		
1	22,79±3,4	2,50±0,4
3	15,09±2,2	2,87±0,6
7	14,19±2,0	2,63±0,6
15	8,68±1,0	1,85±0,4
30	6,13±0,8	2,04±0,4
4-я серия (рентген+ожог)		
1	24,20±5,6	5,93±1,2
3	30,62±6,2	3,93±0,8
7	26,83±7,0	5,38±0,9
15	32,63±9,4	5,07±1,7
30	—	— ¹
5-я серия (рентген+ожог+лазер)		
1	20,81±4,3	4,00±1,1
3	19,52±5,7	2,32±0,8
7	33,58±6,8	4,38±1,3
15	—	— ¹
30	—	— ¹

¹ Измерения не проводили из-за малого числа выживших животных.

* Измерения выполнены Г. А. Геворгяном и В. Л. Татевосяном (Институт биохимии АН Арм ССР), в связи с чем авторы приносят им благодарность.

ток для экзогенного уридина (таблица, рис. 1). Активация транспорта предшественника происходит при всех исследованных воздействиях (серии 2—5) и примерно в равной степени, что говорит о ее неспецифическом характере. В последующие сроки (3 и 7-е сутки) изменения проницаемости происходят по-разному в разных условиях. Так, во 2-й (ожог) и 4-й (рентген+ожог) сериях увеличение продолжается и на 3-и сутки, превышая исходный уровень соответственно на 482 и 424%, а на 7-е сутки возвращается к значениям, которые наблюдались на 1-е сутки. На 15-е сутки проницаемость клеточных мембран у животных с термическими ожогами (2-я серия) нормализуется, а у рентгеноблученных животных с термическими ожогами (4-я серия) вновь повышается.

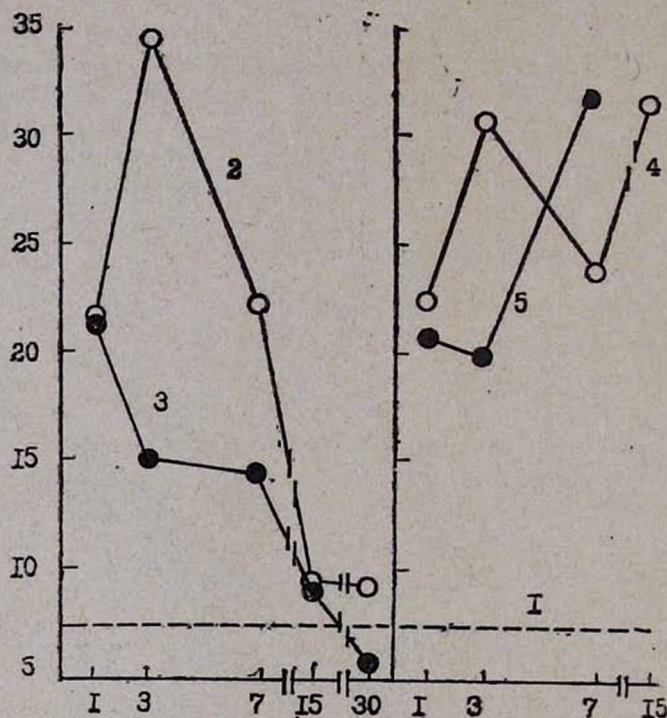


Рис. 1. Скорость транспорта ^3H -уридина через клеточную мембрану. По оси абсцисс: время после начала опыта, сутки; по оси ординат: число распадов на единицу веса ткани. Цифры у кривых обозначают номера серий экспериментов.

Лазерные лучи на 1-е сутки не предотвращают подъема проницаемости клеточных мембран, но препятствуют дальнейшему ее повышению на 3-и сутки (таблица, рис. 1). В 3-й серии (ожог+лазер) на 3—7-е сутки выявляется статистически значимое снижение проницаемости, тогда как в 5-й серии (рентген+ожог+лазер) на 7-е сутки происходит ее сильное возрастание.

Скорость включения ^3H -уридина в РНК изменялась следующим образом (таблица, рис. 2). Во 2-й серии (ожог) увеличение значений этого показателя происходит только на 3-и сутки, тогда как в случае пред-

варительного рентгеновского облучения (4-я серия) наблюдается резкая активация включения меченого предшественника в РНК во все сроки наблюдений. В этой серии динамика включения имеет такой же колебательный характер, как и изменения проницаемости клеточной мембраны (рис. 1), но сдвиги этих показателей разнонаправленные.

Под действием лазерных лучей у животных с ожогом (3-я серия) колебания скорости включения ^3H -уридина в РНК сохраняются в пределах нормы (таблица, рис. 2). В 5-й серии (рентген+ожог+лазер) наблюдается значительно менее выраженное, чем в 4-й серии, увеличение радиоактивности кислотонерастворимой фракции на 1 и 7-е сутки и нормализация этого показателя на 3-и сутки.

Скорость включения ^3H -уридина в РНК зависит от интенсивности ее синтеза. Однако для количественной оценки истинной скорости этого процесса необходимо учитывать транспорт предшественника в клетку [14, 15, 17]. Возможна, к примеру, ситуация, когда при неизменной скорости синтеза РНК включение ^3H -уридина в состав макромолекулы будет изменяться за счет различий во внутриядерном пуле свободного меченого уридина. Величина же пула зависит от скорости транспорта экзогенного предшественника в клетку. Таким образом, располагая данными о скорости транспорта ^3H -уридина в клетку и включения его в РНК, можно с достаточным основанием говорить об активации или подавлении синтеза РНК только в тех случаях, когда эти показатели изменяются разнонаправленно или когда изменяется только один из них.

На основании приведенных сведений (таблица, рис. 1 и 2) можно заключить, что у животных с ожогами (2-я серия) происходит снижение скорости синтеза РНК на 1 и 7-е сутки, а у рентгенооблученных животных с ожогами (4-я серия) — резкие колебания интенсивности синтеза РНК, имеющие большую амплитуду, чем это следует из одних только данных о радиоактивности кислотонерастворимой фракции (рис. 2).

Можно также прийти к выводу, что лучи лазера существенно уменьшают отклонения скорости синтеза РНК от нормы на 3 и 7-е сутки в 3-й серии опытов (ожог+лазер). В 5-й серии (рентген+ожог+лазер) изменения активности синтеза РНК полностью утрачивают колебательный характер, присущий сдвигам этого показателя в 4-й серии. Более того, на 3-и сутки наблюдается приближение скорости синтеза РНК к норме.

Приведенные выше результаты экспериментов свидетельствуют о том, что лазерное облучение способствует нормализации исследованных показателей у животных с ожогами. У животных с радиационно-термическим поражением лазерные лучи уменьшают отклонения от нормы только на 3-и сутки, что, по всей видимости, объясняется большей тяжестью поражения.

В литературе мы не обнаружили количественных исследований действия лазерных лучей на проницаемость клеточных мембран для низкомолекулярных веществ и синтез РНК. Косвенное отношение к предмету нашего исследования имеют работы [2, 5], в которых изучено измене-

ние содержания РНК в интактной коже и ране после лазерного воздействия. Пользуясь полуколичественным цитохимическим методом с визуальной оценкой интенсивности окраски, авторы показали, что в результате воздействия лазерных лучей в клетках возрастает содержание РНК.

Суммируя сведения, изложенные в настоящей работе, можно прийти к следующим заключениям.

1. Ожоговая травма и рентгеновское облучение приводят к резкому повышению проницаемости плазматической мембраны клеток кожи крыс для уридина.

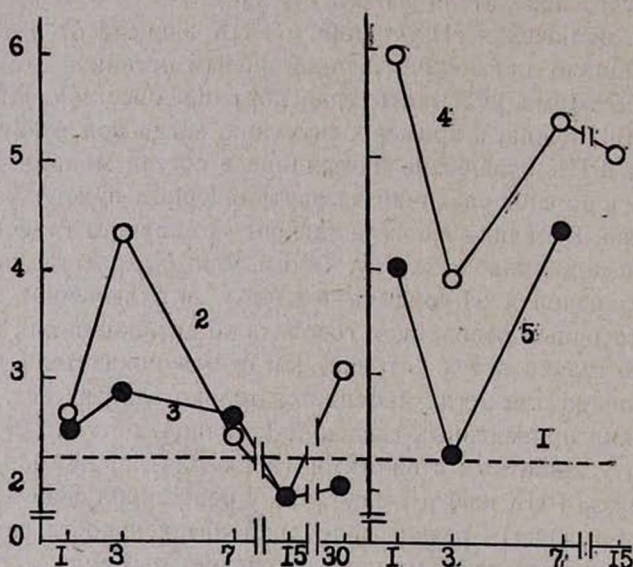


Рис. 2. Скорость включения ^3H -уридина в состав РНК. Обозначения те же, что на рис. 1.

2. В условиях радиационно-термического поражения проницаемость мембран и скорость синтеза РНК подвергаются сильным колебательным изменениям.

3. Лазерные лучи оказывают нормализующее действие на проницаемость клеточных мембран и скорость синтеза РНК у животных с термическими ожогами во все сроки, а в случае значительно более тяжелого радиационно-термического поражения — только в ранние сроки.

Сектор радиобиологии
МЗ Арм.ССР

Поступила 12/VII 1979 г.

**ՌԵՆՏԳԵՆԱԶԱՌԱԳԱՅԹԱՀԱՐՎԱԾ ԵՎ ԶԵՐՄԱՅԻՆ ԱՅՐՎԱԾՔ
ՍՏԱՑԱԾ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՄԱՇԿՈՒՄ ԲՋՋԱՅԻՆ ԹԱՂԱՆԹԻ
ԹԱՓԱՆՑԵԼԻՈՒԹՅԱՆ ՈՒ ՌԵԹ-Ի ՍԻՆԹԵԶԻ ԱՐԱԳՈՒԹՅԱՆ
ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԼԱԶԵՐԱՅԻՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹՆԵՐԻ
ՆԵՐԴՈՐՄՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ**

Հետազոտվել է ռադիացիոն-թերմիկ ախտահարումների պայմաններում առնետների մաշկում բջջային թաղանթի թափանցելիության և ՌԵԹ-ի սինթեզի արագության փոփոխության հարցը մոնոքրոմատիկ կոզերին առաջադրված խնդրի ներգործության ժամանակ:

Պարզվել է, որ 6943 Å-ալիքի երկարություն ունեցող լազերային ճառագայթները կանոնավորող ներգործությունն են ունենում առնետների մաշկում բջջային թաղանթի թափանցելիության վրա IIF-ի ջերմային այրվածքի պայմաններում ուղղամասերության ամբողջ ընթացքում: Իսկ ռադիացիոն-թերմիկ ախտահարումների ժամանակ հիշյալ ճառագայթների կանոնավորող ազդեցությունը նկատվում է միայն վաղ շրջաններում:

V. E. MKHEYAN, G. H. GASPARIAN

**THE EFFECT OF LASER RAYS ON PERMEABILITY OF CELL
MEMBRANE AND SPEED OF RNA SYNTHESIS IN RATS, HAVING
THERMIC BURNS AND IRRADIATED BY X-RAYS**

It is shown that laser rays with the length of waves 6943 Å have a normalizing effect on the transport speed of H-uridine into the cell and its inclusion in the RNA content in animals with thermic burns. In radiative-thermic affections the normalizing effect of laser rays is expressed in earlier terms.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гукасян А. А. Воен.-мед. журн., 1960, 8, стр. 57.
2. Задорожный Б. А., Яковцова А. Ф., Дюба В. М. Дерматология и венерология, 1977, 12, стр. 30.
3. Инюшин В. М., Чекуров П. Р. Биостимуляция лучом лазера и биоплазма. Алма-Ата, 1975.
4. Ковинский И. Т. Здравоохранение Казахстана, 1973, 5, стр. 46.
5. Корытный Д. Л. В кн.: О биологическом действии монохроматического красного света. Алма-Ата, 1967, стр. 54.
6. Лапун И. Б. Радиобиология, 1978, 18, стр. 628.
7. Методы биологии развития. М., 1974.
8. Мхейан В. Е., Азатян А. С. Ж. экспер. и клин. мед. АН Арм.ССР, 1979, 3, стр. 59.
9. Поляков В. Н. В кн.: Расширенный пленум ученых советов институтов травматологии. М., 1956, стр. 152.

10. Рахишев А. Р. В кн.: Биологическое действие лазерного излучения. Алма-Ата 1977, стр. 3.
11. Токарская В. И. Радиобиология, 1976, 16, стр. 643.
12. Токарская В. И., Уманский С. Р. В кн.: Биофизика сложных систем и радиационных нарушений. М., 1977, стр. 163.
13. Третьяк Н. Н., Костенко М. А. Цитология, 1978; 18; стр. 432.
14. Эйбус Л. Х., Ермакова В. М., Левитман М. Х. Радиобиология, 1978; 18, стр. 163.
15. Cunningham G. H., Pardee A. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 64, 1049.
16. Robinson J. E., Wincenberg M. J., McCready W. A. Radiology, 1974, 113, 195.
17. Subbarao M. N., Netrawali M. S., Pradham D. S. Experimentia, 1978, 34, 1279.