

© О. В. Ермакова, А. В. Павлов, Л. И. Есеев, Т. В. Кораблева, 2014
УДК 612.014.4:611.018.7:599.323.4

О. В. Ермакова¹, А. В. Павлов², Л. И. Есеев² и Т. В. Кораблева²

ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИЛИАРНОГО АППАРАТА РЕСНИЧАТОГО ЭПИТЕЛИЯ ТРАХЕИ И МАТОЧНЫХ ТРУБ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ХРОНИЧЕСКОГО НИЗКОИНТЕНСИВНОГО γ -ИЗЛУЧЕНИЯ

¹ Отдел радиозологии (зав. — проф. В. Г. Зайнуллин), Институт биологии Коми НЦ Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар; ² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. В. Павлов), Ярославская государственная медицинская академия

С помощью комплексной методики прижизненного микроскопического наблюдения изучена двигательная активность цилиарного аппарата (ДАЦА) эпителиальной выстилки трахеи и маточных труб и скорость движения слизи в трахее у 14 белых крыс-самок линии Вистар, подвергнутых экспериментальному хроническому γ -облучению на протяжении 55–70 сут (суммарные поглощенные дозы 0,05 и 0,5 Гр), и 10 контрольных животных, находившихся в условиях естественного радиационного фона. По сравнению с контролем у облученных животных выявлено значимое уменьшение частоты биения ресничек на 12% в трахее (суммарная доза 0,05 Гр) и на 14–15% в маточных трубах (суммарные дозы 0,05 и 0,5 Гр); скорость движения слизи в трахее при дозе 0,05 Гр была снижена на 63%. Значимых различий ДАЦА эпителия маточных труб у животных, находящихся в неактивном (диэструс) и активном периодах эстрального цикла, не выявлено. Полученные данные позволяют считать изучение ДАЦА эпителия трахеи и маточных труб в опытах *in vivo* адекватным методом биоиндикации эффекта малых доз ионизирующего излучения на организм.

Ключевые слова: реснитчатый эпителий, цилиарный аппарат, двигательная активность, низкоинтенсивное γ -облучение

Поиск клеточных систем, позволяющих зарегистрировать эффекты хронического низкоинтенсивного γ -излучения (диапазон поглощенных доз до 0,5 Гр), является актуальной задачей современной радиобиологии и экологической морфологии. Наиболее перспективными в этом плане являются растущие (медленно обновляющиеся) клеточные популяции, способные на протяжении достаточно продолжительного времени сохранять и накапливать структурные изменения, связанные с влиянием повреждающих факторов: в рамках развития данного направления исследований ранее нами показана высокая информативность микроядерного теста для раннего выявления лучевых поражений генетического аппарата фолликулярного эпителия щитовидной железы [1]. В литературе отражены единичные наблюдения радиочувствительности цилиарного аппарата реснитчатых эпителиоцитов к непродолжительному (до 2,5 ч) воздействию ионизирующего излучения не только в высоких (1–10 Гр) [7, 9], но и в низких (менее 0,02 Гр) дозах [4, 10]. Однако данные о влиянии этого фактора на функцию ресничек в условиях хронического воздействия в литературе отсутствуют.

Задачей настоящего исследования явилось изучение в опытах *in vivo* двигательной активности цилиарного аппарата (ДАЦА) реснитчатого эпителия трахеи и маточных труб у крыс после хронического воздействия внешнего низкоинтенсивного γ -излучения на организм животных.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 24 крысах-самках линии Вистар массой 200–250 г, которые были разделены на 3 группы: контрольную, 1-ю подопытную и 2-ю подопытную. В обеих подопытных группах общее γ -облучение животных проводили в «домике хронического облучения». Источником облучения были 2 ампулы со стальной оболочкой, содержащие $0,474 \times 10^6$ и $0,451 \times 10^6$ кБк ^{226}Ra , разнесенные на расстояние 2,5 м. Дозовая нагрузка на организм животных определялась мощностью экспозиционной дозы и сроками содержания в условиях облучения. Крысы находились в зоне воздействия ионизирующего излучения круглосуточно с перерывами на кормление и уборку помещения. Суммарную поглощенную дозу облучения определяли по показаниям термолуминесцентных дозиметров (ДТИ), которые входят в состав дозиметрической термолуминесцентной установки ДВГ-02ТМ (Научно-производственное предприятие «Доза», Россия).

В 1-й подопытной группе ($n=7$) суммарная поглощенная доза облучения была минимальной и составила 5 сГр (мощность 35–40 мкГр/ч), во 2-й группе ($n=7$) — 50 сГр (мощность дозы 350–400 мкГр/ч). В обеих группах эксперименты начинались одновременно, продолжительность облучения составила 70 сут, прижизненное исследование цилиарного

Сведения об авторах:

Ермакова Ольга Владимировна, отдел радиозологии, Институт биологии Коми научного центра, 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28;

Павлов Алексей Владимирович (e-mail: pavlov@yma.ac.ru), Есеев Леонид Иванович, Кораблева Татьяна Владимировна, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

аппарата трахеи и маточных труб проводили через 10–14 сут после окончания облучения. Животные контрольной группы ($n=10$) находились при естественном радиационном фоне в условиях, строго идентичных с подопытными. Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Прижизненную видеофиксацию состояния реснитчатого эпителия (частота биения ресничек в трахее и маточных трубах, скорость движения слизи в трахее) осуществляли у наркотизированных животных (уретановый наркоз 1000 мг/кг, внутривенно) согласно детально описанному ранее комплексному алгоритму [6], после завершения прижизненных наблюдений животных декапитировали.

Скорость движения слизи в трахее определяли на видеофайлах с помощью модифицированной для крыс методики измерения скорости мукоцилиарного транспорта, основанной на регистрации перемещения инертного маркера по поверхности слизистой оболочки [5]. ДАЦА эпителиальной выстилки трахеи и маточных труб изучена с помощью диагностического комплекса (научно-производственный комплекс «Азимут», Россия), состоящего из микроскопа, высокоскоростной видеокамеры с платой видеозахвата и персонального компьютера со специализированным программным обеспечением. Образцы поперечных срезов трахеи и продольных срезов маточных труб толщиной до 1 мм, взятые из центральных участков органов, помещали в лункообразное углубление предметного стекла, заполненное средой Игла MEM и предварительно нагретого на термостатике до 32 °C. Препарат накрывали тонким покровным стеклом и под микроскопом при об. 40 и 90 проводили поиск зоны с отчетливо видимым движением ресничек эпителиоцитов, захват сфокусированного изображения с последующим сохранением видеофайла и его компьютерным анализом.

Для определения фаз эстрального цикла у крыс брали влагалищные мазки, которые изучали микроскопически после окраски гематоксилином—эозином [3]. Для статистических сравнений отдельно рассчитывали исследуемые параметры для межтечкового (относительного покоя — диэструс) и течкового (проэструс, эструс, метэструс) периодов [6, 12]. Цифровой материал обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты исследования. Мукоцилиарный транспорт в трахее. У животных после хронического облучения в минимальных дозах (1-я подопытная группа, суммарная поглощенная доза 0,05 Гр) обнаружено статистически значимое по сравнению с контролем снижение частоты биения ресничек на 12% и скорости движения слизи на 63% (таблица). В то же время, у крыс, получивших суммарную дозу 0,5 Гр (2-я подопытная группа), оба изученных показателя статистически значимо не отличались от таковых в контрольной группе наблюдений (см. таблицу). Хотя средние значения ДАЦА в этой серии наблюдений также были ниже уровня контроля (–13%), высокая вариабельность индивидуальных значений в группе (коэффициент вариации — 23,8% по сравнению с 2,8% у необлученных животных) не позволяет сделать однозначных выводов при данном объеме выборки.

Мерцательная активность эпителия маточных труб. Анализ средних значений частоты биения ресничек с учетом фаз эстрального цикла показал, что и в опыте, и в контроле статистически значимых различий данного показателя у животных, находящихся в течковом и межтечковом периодах эстрального цикла, не выявлено ($P>0,05$); на основании этого статистический анализ влияния изученного фактора проводился в рамках объединенных групп (без учета фаз эстрального цикла). Обнаружено, что в обеих подопытных группах средние значения ДАЦА были значимо на 14–15% ниже, чем у необлученных животных (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. Результаты экспериментов свидетельствуют об одностороннем эффекте хронического низкоинтенсивного γ -излучения — угнетении частоты биения ресничек эпителия маточных труб и трахеи. Значимого влияния на ДАЦА дополнительных факторов, связанных с циклическими гормональными перестройками (эстральный цикл) при данном объеме выборки не обнаружено, аналогичные результаты получены также D.Sh и соавт. при изучении маточных труб у мышей [12].

Итоги нашего исследования, в целом, согласуются с данными Ю.И.Ивановского и А.А.Карпенко [2, 4, 10], которые при кратковре-

Двигательная активность цилиарного аппарата трахеи и маточных труб и скорость движения слизи в трахее у контрольных крыс и при воздействии γ -излучения ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группа животных	Трахея		Маточные трубы		
	Частота биения ресничек, Гц	Скорость движения слизи, мм/с	Частота биения ресничек, Гц		
			Без учета фаз эстрального цикла	Периоды эстрального цикла	
				межтечковый (диэструс)	течковый
Контрольная	12,36 $\pm$ 0,14	0,12 $\pm$ 0,03	18,2 $\pm$ 0,5	18,4 $\pm$ 0,6	18,0 $\pm$ 0,9
1-я подопытная — при суммарной поглощенной дозе γ -излучения 0,05 Гр	10,9 $\pm$ 0,5*	0,040 $\pm$ 0,010*	15,59 $\pm$ 0,27*	15,9 $\pm$ 0,4*	15,3 $\pm$ 0,4*
2-я подопытная — при суммарной поглощенной дозе γ -излучения 0,5 Гр	10,7 $\pm$ 0,9	0,13 $\pm$ 0,04	16,1 $\pm$ 0,3*	15,6 $\pm$ 0,4*	16,4 $\pm$ 0,4

*Различия по сравнению с контролем значимы при $P<0,05$.

менном низкоинтенсивном γ -излучении (0,0075–1,9 сГр длительностью 1–2,5 ч) обнаружили снижение двигательной активности ресничек эпителиоцитов жабр мидии, клеток обонятельного эпителия у лягушки, а также волнообразный характер изменения частоты колебаний и нарушение синхронизации биений ресничек в трахее у крыс.

В основе влияния ионизирующего излучения на цилиарный аппарат могут лежать универсальные механизмы стойкого нарушения активности, локализованных в аксонеме протеинкиназ С, приводящие к снижению двигательной активности ресничек при воздействии повреждающих факторов (сигаретный дым, алкоголь), а также при старении [8, 13]. Нельзя исключить воздействия γ -излучения на моторные белки ресничек и через другие внутриклеточные регуляторные механизмы [2, 11], а также радиоиндуцированные повреждения ультраструктур ресничек, аналогичные наблюдаемым при облучении высокими дозами [7].

Полученные экспериментальные данные позволяют считать изучение ДАЦА эпителия трахеи и маточных труб в опытах *in vivo* адекватным методом биоиндикации эффекта малых доз ионизирующего излучения на организм и убедительно свидетельствуют о целесообразности проведения дальнейших исследований в этом направлении с целью получения результатов, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение.

Работа частично поддержана проектом конкурсных программ научных исследований УрО РАН №12-У-4-1015, доложена на Международной конференции «Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды» (Россия, г. Сыктывкар, 17–21 марта 2014 г.).

ЛИТЕРАТУРА

- Ермакова О.В., Павлов А.В. и Кораблева Т.В. Цитогенетические эффекты в фолликулярном эпителии при длительном воздействии низкоинтенсивного гамма-излучения. Радиационная биология. Радиоэкология, 2008, т. 48, № 2, с. 160–166.
- Ивановский Ю.А. Эффект радиационной стимуляции при действии больших и малых доз ионизирующего облучения: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук, Владивосток, 2006.
- Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. Основные методики экспериментально-эндокринологических исследований. М., изд. МГУ, 1968.
- Карпенко А.А. и Ивановский Ю.А. Мерцательный эпителий трахеи крыс чувствителен к γ -облучению в сверхмалых дозах. Радиобиология, 1992, т. 32, вып. 5, с. 701–705.
- Марков Г.И., Марков М.Г. и Жуков С.К. Методика исследования транспортной функции мерцательного эпителия слизистой оболочки полости носа у теплокровных животных. Вестн. оторинолар., 1996, № 1, с. 35.
- Павлов А.В. и Есев Л.И. Методические подходы к комплексному изучению функциональной морфологии эпителиальной выстилки трахеи в эксперименте. Морфология, 2012, т. 142, вып. 6, с. 73–76.
- Albertsson M., Baldetorp B., Hakansson C.H. and von Mecklenburg C. The effects of 10 Gy single-dose irradiation on the ciliated epithelium measured during and one-to-ten days following irradiation. A comparative physiological and morphological study. In: Scan. Electron.Microsc., 1984, Pt. 2, p. 813–824.
- Bailey K. L., Bonasera S. J., Wilderdyke M. et al. Aging causes a slowing in ciliary beat frequency, mediated by PKC ϵ . Am. J. Lung. Cell Mol. Physiol., 2014, v. 306, № 6, p. 584–589.
- Baldetorp B. and Baldetorp L. Effect of repeat irradiation of the tracheal ciliary cell activity. Acta Radiol. Oncol., 1985, v. 24, № 4, p. 369–373.
- Karpenko A.A. and Ivanovsky Yu.A. Effect of very low doses of γ -radiation on motility of gill ciliated epithelia of *Mytilus edulis*. Radiat. Res., 1992, v. 132, № 1, p. 106–110.
- Salathe M. Regulation of mammalian ciliary beating. Annu. Rev. Physiol., 2007, v. 69, p. 401–422.
- Shi D., Komatsu K., Uemura T. and Fujimori T. Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport in the mouse oviduct. Genes Cells, 2011, v. 16, № 3, p. 282–290.
- Wyatt T.A., Sisson J.H., Allen-Gipson D.S. et al. Co-exposure to cigarette smoke and alcohol decreases airway epithelial cell cilia beating in a protein kinase C ϵ – dependent manner. Am. J. Pathol., 2012, v. 181, № 2, p. 431–440.

Поступила в редакцию 19.06.2014

MOTOR ACTIVITY OF THE CILIARY APPARATUS OF THE CILIATED EPITHELIUM OF THE TRACHEA AND THE UTERINE TUBES AFTER EXPOSURE TO CHRONIC LOW-LEVEL γ -RADIATION

O. V. Yermakova, A. V. Pavlov, L. I. Yesev and T. V. Korablyova

Using a complex technique of intravital microscopic observation, the motor activity of the ciliary apparatus (MACA) in the epithelial lining of the trachea and the uterine tubes and the speed of mucus flow in the trachea were studied in 14 albino female Wistar rats, which were subjected to experimental chronic γ -radiation for a period of 55–70 days (the total radiation doses absorbed equal to 0.05 and 0.5 Gy) and in 10 control animals, which were kept under the conditions of a natural background radiation. Compared to control rats, the irradiated animals demonstrated a significant reduction in the ciliary beat frequency by 12% in the trachea (a total dose of 0.05 Gy) and 14–15% in the uterine tubes (a total dose of 0.05 and 0.5 Gy); meanwhile, the speed of the mucus flow in trachea was decreased by 63% at a dose of 0.05 Gy. No significant differences of MACA were found in the tubal epithelium in the animals that were in the inactive (diestrus) and active periods of the estrous cycle. The data obtained suggest that the study of MACA in the epithelia of the trachea and the uterine tubes in *in vivo* experiments is an adequate method of the bioindication of the effect of low doses of ionizing radiation on the organism.

Key words: *ciliary apparatus, motor activity, ciliated epithelium, low-intensity γ -radiation*

Department of Radioecology, Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch of RAS, Syktывkar; Department of Histology, Cytology and Embryology, Yaroslavl' State Medical Academy