А.Н. Гребенюк^{1,2}, Н.И. Заргарова¹, А.Ю. Кондаков¹, В.И. Легеза¹

МОДЕЛИРОВАНИЕ СОЧЕТАННОГО РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ, ОБУСЛОВЛЕННОГО ОБЩИМ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЕМ И РЕНТГЕНОВСКИМ ОЖОГОМ КОЖИ, В ОПЫТАХ НА КРЫСАХ

A.N. Grebenyuk^{1,2}, N.I. Zargarova¹, A.Y. Kondakov¹, V.I. Legeza¹

Modeling of the Combined Radiation Injury Caused by the Total Whole Body Gamma-Irradiation and Local X-Ray Burn of Skin in Experiments on Rats

ΡΕΦΕΡΑΤ

<u>Цель:</u> Моделирование сочетанного радиационного поражения, обусловленного общим гамма-облучением всего тела и местным лучевым ожогом III-б степени тяжести от воздействия рентгеновского излучения, в эксперименте на крысах.

Материал и методы: Моделирование сочетанного радиационного поражения использовали 180 белых беспородных крыссамцах массой 180-200 г. Общее облучение осуществляли с помощью источника γ-излучения ¹³⁷Cs; животных облучали в дозах 5,0; 6,0; 6,5 и 6,75 Гр при мощности дозы 1,37 Гр/мин. Моделирование глубоких лучевых ожогов III-б степени проводили на рентгенотерапевтической установке РУМ-17 при напряжении на рентгеновской трубке 250 кВп, анодном токе 15 мА, кожнофокусном расстоянии 25 см, без фильтров, при мощности дозы 3,3 Гр/мин. Рентгеновский ожог площадью 10 % поверхности тела наносили на область спины животного. Физическую зашиту подлежащих органов и тканей от рентгеновского излучения осуществляли свинцовой пластиной, введенной под облучаемый участок кожи спины лабораторного животного, а защиту тела от рассеянного ионизирующего излучения проводили с использованием свинцового экрана.

<u>Результаты:</u> Установлено, что общее γ -облучение крыс в диапазоне доз от 5,0 до 6,75 Гр сопровождается гибелью 10—60 % животных в сроки, характерные для костномозговой формы острого лучевого синдрома. Рентгеновское облучение кожи спины в дозе 60 Гр на площади 10 % поверхности тела способствует увеличению летальноости тотально облученных крыс в среднем на 40 %. Общее γ -облучение, в свою очередь, значительно (в 1,5—1,7 раза) увеличия с период заживления местного радиационного поражения у крыс.

На основании полученных данных предложена экспериментальная модель сочетанного радиационного поражения, включающая общее γ -облучение крыс в дозе 5 Гр с последующим рентгеновским облучением кожи спины на площади 10 % поверхности тела в дозе 60 Гр. Использование указанной модели позволяет воспроизвести как клинику острого лучевого синдрома, так и динамику деструктивных и репаративных процессов в коже, характерную для глубокого лучевого ожога у человека; при этом наблюдаются типичные для сочетанного поражения проявления феномена взаимного отягощения.

<u>Вывод:</u> Полученные данные позволяют рекомендовать разработанную модель для скрининга средств консервативного лечения сочетанных радиационных поражений.

Ключевые слова: экспериментальное моделирование, сочетанное радиационное поражение, *ү*-облучение, рентгеновский ожог кожи, взаимное отягощение, крысы

ABSTRACT

<u>Purpose</u>: Modeling of the combined radiation injury caused by the total whole body γ -irradiation and deep local radiation burn from X-ray irradiation in experiment on rats.

<u>Material and methods</u>: 180 males of white inbred rats weighing 180–200 g were used for modeling of the combined radiation injury. The total whole body irradiation carried out by γ -radiation source of 137Cs, animal irradiated in doses 5.0; 6.0; 6.5 and 6.75 Gy at the dose power 1.37 Gy/min. The roentgen-therapeutic device RUM-17 was used for modeling of deep local radiation burns at a tension on a X-ray tube of 250 kVp, anode current 15 mA, skin focal length 25 cm, without filters, at the power of dose 3.3 Gy/min.

The X-ray burn of 10 % of the surface of the body was applied on the area of the animal's back. Physical protection of the subject bodies and fabrics against X-ray irradiation was carried out by the lead plate entered under the irradiated site of the skin at the a back of a laboratory animal, and protection of a body against γ -irradiation was carried out by the lead screen.

<u>Results</u>: It is established that the total whole body γ -irradiation of rats varies in the range of doses from 5.0 to 6.75 Gy is followed by death of 10–60 % of animals from acute radiation syndrome.

X-ray irradiation of skin of a back in a dose 60 Gy on the area of 10 % of a surface of a body promotes the increase in a lethality of total irradiated rats on average for 40 %. The total γ -irradiation, in turn, was considerable (by 1.5–1.7 times) increased the period of healing of local radiation burn at rats.

On the basis of the obtained data the experimental model of the combined radiation injury, including the total whole body γ -irradiation of rats in a dose of 5 Gy with the local X-ray irradiation of skin of a back on the area of 10 % of a surface of a body in a dose of 60 Gy was offered. The use of the specified model allows to reproduce both clinic of acute radiation syndrome and dynamics of destructive and reparative processes in skin with deep local radiation burn; thus manifestations of a phenomenon of mutual burdening, typical for the combined injures, are observed.

<u>Conclusion</u>: The obtained data allows to recommend the developed model for screening of means of conservative treatment of the combined radiation injury.

Key words: experimental modeling, combined radiation injury, γ -irradiation, X-ray, burn of skin, mutual burdening, rats

¹ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург

² Специальная и медицинская техника, Санкт-Петербург. E-mail: grebenyuk_an@mail.ru ¹ S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg ² Special and Medical Equipment St. Petersburg, Pusci

² Special and Medical Equipment, St. Petersburg, Russia. E-mail: grebenyuk_an@mail.ru

Введение

В соответствии с существующей терминологией [1] сочетанные радиационные поражения (СРП) представляют собой результат одновременного или последовательного воздействия внешнего излучения и (или) аппликации на кожу и слизистые оболочки радионуклидов, их поступления внутрь организма через органы дыхания и пищеварения, а также через раневые и ожоговые поверхности. К числу наиболее тяжелых вариантов СРП относятся комбинации внешнего облучения и местные радиационные поражения (МЛП), прежде всего лучевые ожоги кожи [2, 3].

В литературе подробно описаны массовые случаи СРП у жителей Маршалловых островов, подвергшихся воздействию γ - β -излучения вследствие выпадения радиоактивных осадков, вызванных испытанием США термоядерного оружия [4], у пострадавших при авариях на советских атомных подводных лодка [5], а также у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС [6, 7].

Особенно тяжелым течением отличались СРП у пострадавших в результате Чернобыльской трагедии, когда внешнее облучение сочеталось с глубокими радиационными ожогами кожи [8, 9]. Даже в условиях комплексного применения самых эффективных (на тот период времени) противолучевых средств и методов лечения летальность у таких пострадавших была весьма высокой, что свидетельствует о необходимости поиска новых эффективных средств лечения СРП.

К числу важных, а по сути необходимых, условий успешности проведения таких исследований на доклиническом этапе относится наличие адекватных экспериментальных моделей СРП, соответствующих следующим основным требованиям. Первым и главным из них является возможность в опытах на лабораторных животных достаточно надежно воспроизводить основные клинические проявления и патогенетические механизмы развития компонентов поражения человека. Во-вторых, все количественные параметры модели должны быть доступны для надежного и достаточно простого измерения и легко воспроизводимы. И, наконец, модель должна быть экономически доступной и пригодной в этом плане для широкого скрининга лекарственных средств. Разработка такой модели и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Опыты выполнены на 180 белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г, выдержанных в течение 2 нед в карантине в условиях стандартного питания. Выбор крыс для исследования был обусловлен тем, что строение отдельных слоев кожи у животных

этого вида, сроки клеточного обновления и реакция на радиационное воздействие близки к коже человека [10–12]. Исследования выполнены в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных и Европейской конвенции по их защите, изложенной в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС) [13].

Общее облучение животных осуществляли с помощью источника гамма-излучения ¹³⁷Cs. Дозы γ -облучения составляли 5,0; 6,0; 6,5 и 6,75 Гр при мощности дозы 1,37 Гр/мин.

Для моделирования глубоких лучевых ожогов кожи использовали стандартный рентгенотерапевтический аппарат РУМ-17, предназначенный для проведения средней и глубокой лучевой терапии методом статического облучения. Облучение осуществляли при постоянном напряжении на рентгеновской трубке 250 кВп, номинальном анодном токе 15 мА. Минимальное расстояние между трубкой аппарата и телом животного составляло 25 см, что позволяло помещать его и защитные приспособления под облучательную установку. Для достижения максимальной дозы на кожу облучение осуществляли без использования фильтров. Доза местного облучения кожи составляла 60 Гр, мощность дозы – 3,3 Гр/мин. Как показано нами ранее [14], рентгеновское облучение с такими параметрами вызывает в коже развитие лучевого ожога III-б степени с полным некрозом поверхностных участков дермы и придатков кожи, при этом нижняя граница зоны некроза не выходит за рамки сетчатого слоя, располагаясь в верхней трети дермы.

Площадь облучаемого участка кожи составляла 10 % поверхности тела. Для предотвращения облучения внутренних тканей и органов под кожу облучаемого участка спины животного вводили и фиксировали свинцовый экран толщиной 2 мм, шириной 35 мм, длиной 120 мм. После облучения пластину извлекали и рану ушивали. Контрольные эксперименты с наблюдением за необлученными животными, которым под кожу спины временно (на 15 мин) имплантировали свинцовую пластину, показали, что общее состояние крыс не изменялось, раневой процесс протекал без осложнений.

Для защиты тела животного от рассеянного ионизирующего излучения применяли свинцовый экран толщиной 5 мм, с прорезью размером 35 × 120 мм, обеспечивающий возможность локального облучения депилированного участка кожи спины. Более подробно техника локального рентгеновского ожога кожи описана ранее [14].

В ходе эксперимента оценивали визуальные признаки формирования (деструктивная фаза) и заживления (репаративная фаза) локального лучевого поражения кожи [15]. В деструктивную фазу отмечали сроки появления эритемы и формирования струпа, определяли продолжительность периода экссудации. В репаративную фазу регистрировали сроки отслоения струпа и определяли продолжительность периода заживления.

Скорость заживления раневой поверхности определяли по формуле Л.Н. Поповой [16]:

 $(S-S_n) \times 100$

S×T

где S — площадь лучевого ожога на срок формирования струпа, мм²; S_n — площадь лучевого ожога при данном измерении, мм²; T — интервал времени между измерениями, сут.

Степень лучевых повреждений кожи оценивали по существующей классификации [17]. Учитывали летальность облученных животных и продолжительность их жизни в течение 30 сут после радиационного воздействия, а также динамику изменений количества лейкоцитов в периферической крови по стандартной методике [18].

Результаты исследования подвергали стандартному статистическому анализу с расчетом среднего значения и ошибки средней. Оценку различий данных, полученных при анализе выборок малого объема, проводили непараметрическими методами с использованием критерия Вилкоксона—Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали (табл. 1), что после общего γ-облучения в минимальной из исследованных доз (5 Гр) 30-суточная выживаемость крыс составила 90 %. По мере увеличения дозы выживаемость облученных крыс неуклонно снижалась, доза 6,75 Гр вызывала гибель уже почти 60 % животных.

Рентгеновский ожог 10 % кожи у тотально облученных крыс способствовал снижению их выживаемости (по сравнению с группой «контроль облучения») в среднем на 40 % независимо от использованной дозы общего радиационного воздействия. СД_{50/30} у животных, подвергнутых сочетанному ра-

Таблица 2

Влияние общего γ-облучения в различных дозах на динамику клинического течения поражения кожи у крыс, подвергнутых местному рентгеновскому облучению в дозе 60 Гр (X±m., n = 12 в каждой группе)

(x) F J							
Доза общего облучения, Гр	Длительность деструктивных процессов			Длительность репаративных процессов			
	Латентный пери- од эритемы, сут	Период экссудации, сут	Срок формирова- ния струпа, сут	Срок отслоения струпа, сут	Период заживления, сут	Скорость зажив- ления, % сут ⁻¹	
0 (контроль облучения)	7,3±0,3	6,1±0,2	13,2±0,5	60,5±2,8	47,1±3,0	2,2±0,2	
5,0	7,5±0,8	5,2±0,7	13,0±0,6	79,0±10,3*	67,0±5,8*	1,6±0,3*	

Примечание:

* — различия достоверны по сравнению с контролем, *p* < 0,05

Таблица 1

Влияние местного рентгеновского облучения кожи в дозе 60 Гр на 300-суточную выживаемость крыс, подвергнутых общему γ-облучению в различных дозах (X± mx, n = 12 в кажлой группе)

Доза	Vслория	Выживаемость		Продолжительность			
облуче-	эксперимента	абс. ед.	%	жизни павших			
ния, Гр	эксперимента			животных, сут			
5,0	контроль облучения	11	90±8	10±5			
	СРП	6	50 ± 15	17±7			
6,0	контроль облучения	8	75±13	18±6			
	СРП	4	33±15	15±5			
6,5	контроль облучения	7	58±15	16±7			
	СРП	2	17±13	14±6			
6,75	контроль облучения	5	42±15	15±8			
	СРП	0	0±8	13±6			

Примечание:

* — различия достоверны по сравнению с контролем, p < 0.05

диационному поражению, снижалась по сравнению с группой «контроль облучения» в 1,3 раза.

Как при самостоятельном γ -облучении, так и в условиях СРП гибель павших животных отмечалась спустя 10–20 сут после начала эксперимента, т.е. в сроки, характерные для костномозговой формы острого радиационного синдрома у грызунов [19]. Этот вывод подтверждается данными гематологических исследований: количество лейкоцитов в крови животных, облученных в минимальной из исследованных доз (5 Гр), снижалось в 8 раз и к 30 сут эксперимента составляло не более 60 % от исходного уровня.

Как видно из табл. 1, отягощающее действие местного облучения на течение радиационного поражения, вызванного общим γ-воздействием, наблюдалась уже при минимальной из использованных доз (5 Гр), что позволило использовать последнюю в качестве одного из компонентов экспериментальной модели СРП. В этой связи влияние общего облучения на динамику процессов формирования и заживления глубокого лучевого ожога оценивали с использованием модели, включающей тотальное γ-облучение в дозе 5 Гр и местное воздействие рентгеновского излучения в дозе 60 Гр. При таком варианте СРП наблюдается, с одной стороны, достаточно высокая летальность (50 %), с другой –количество выживающих крыс позволяет получить адекватное представление о динамике деструктивной и репаративной фаз лучевого ожога кожи [11, 20].

Как видно из табл. 2, продолжительность деструктивного периода в облученной коже как при сочетанном, так и при местном радиационном поражении была практически одинаковой. В то же время на процессы, протекающие в репаративном периоде, общее облучение оказывало весьма существенное влияние. Так, под действием общего γ-облучения в дозе 5 Гр период заживления ожога увеличивался почти в 1,5 раза, а скорость заживления раны, соответственно, на 30 %. Эти различия отчетливо видны на рис. 1.

Таким образом, на основе разработанной экспериментальной модели сочетанного радиационного поражения (общее γ- и местное рентгеновское облучение крыс) показано наличие феномена взаимного отягощения при данном варианте радиационной патологии. Феномен проявляется повышением летальности и более выраженным процессом угнетения процессов репарации местного радиационного поражения по сравнению с изолированными (самостоятельными) компонентами СРП.



Рис. 1. Различия в динамике заживления глубоких лучевых ожогов у животных при местном лучевом поражении (а) и сочетанном радиационном поражении (б)

а) 55 сут после облучения кожи в дозе 60 Гр (изолированный лучевой ожог);

б) 55 сут после облучения кожи в дозе 60 Гр и общего гамма-облучения в дозе 4 Гр

Заключение

Установлено, что моделирование СРП, включающих общее облучение и глубокий лучевой ожог, может быть осуществлено путем последовательного радиационного воздействия на крыс сначала общего γ -облучения в дозе 5 Гр, а затем местного облучения кожи спины на площади 10 % поверхности тела от рентгеновского излучения в дозе 60 Гр. Защиту тела животных от рассеянного рентгеновского излучения осуществляют применением свинцового экрана с линейной прорезью, позволяющей проводить локальное облучение депилированного участка кожи спины. Защиту подлежащих органов и тканей осуществляют путем применения свинцовой пластины, которую хирургическим путем имплантируют под кожу животных на время облучения.

Предлагаемый способ моделирования позволяет воспроизводить в эксперименте на крысах одинаковые по степени тяжести острую лучевую болезнь и глубокие лучевые ожоги; изучать влияние площади и степени поражения кожи на течение и исходы СРП в зависимости от выбранных доз общего облучения; воспроизводить основные клинические проявления СРП, в т.ч. феномен взаимного отягощения; проводить доклиническую оценку эффективности противолучевых и ранозаживляющих средств, предназначенных для профилактики и лечения глубоких радиационных поражений кожи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Легеза В.И., Ушаков И.Б., Гребенюк А.Н. Радиобиология, радиационная физиология и медицина. – Воронеж: ИПЦ «Научная книга». 2013. 152 с.
- Барабанова А.В. Местные лучевые поражения кожи // Мед. радиол. и радиац. безопасность. 2010. Т. 55. № 5. С. 79–84.
- 3. Meineke V. The role of damage to the cutaneous system in radiation-induced multi-organ failure // Br. J. Radiol., 2005. Vol. 27. Suppl. P. 85–99.
- 4. Изучение последствий ядерных взрывов. Пер. с англ. М.: Медицина. 1964. 479 с.
- Гогин Е.Е., Емельяненко В.М., Бенецкий Б.А. и соавт. Сочетанные радиационные поражения. – М.: ППО «Известия». 2000. 240 с.
- Радиационная медицина: Руководство для врачейисследователей и организаторов здравоохранения. Под ред. Л.А. Ильина. в 4 томах. Т. II. Радиационные поражения человека. — М.: ИздАТ. 2001. 432 с.
- Barabanova A.J. Local Radiation Injury // In: Medical Management of Radiation Accidents. Eds. by I.A. Gusev, A.K. Guskova, F.A. Mettler. 2nd ed. – Boca Raton. Fl: CRC Press. 2001. P. 223–240.

- Куськова А.К. Острые эффекты облучения у пострадавших при аварии на Чернобыльской АЭС // Мед. радиол. и радиац. безопасность. 1987. Т. 32. № 12. С. 3–18.
- 9. Gottlöber P., Steinert M., Weiss M. et al. The outcome of local radiation injuries: 14 years of follow-up after the Chernobyl accident // Radiat. Res. 2001. Vol. 155. № 3. P. 409–416.
- 10. Ковешенко Ю.Н. Кожа человека. Том 1. М.: Медицина. 2006. 360 с.
- Hopewell J.W. The skin: its structure and response to ionizing radiation // Int. J. Radiat. Biol., 1990. Vol. 57. № 4. P. 751–773.
- 12. Stewart F.A., Akleyev A.V., Hauer-Jensen M. et al. ICRP Publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs-threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context // Ann. ICRP. 2012. Vol. 41. № 1–2. P. 1–322.
- 13. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Rus–LASA. «НП Объединение специалистов по работе с лабораторными животными». – СПб. 2012. 48 с.
- 14. Заргарова Н.И., Владимирова О.О., Легеза В.И., Гребенюк А.Н. Моделирование глубоких поражений кожи в эксперименте на крысах // Мед. радиол. и радиац. безопасность. 2014. Т. 59. № 3. С. 5–11.
- Африканова Л.А. Острая лучевая травма кожи. М.: Медицина. 1975. 193 с.
- Раны и раневая инфекция. Под ред. М.И. Кузина.
 Б.М. Костюченок. М.: Медицина. 1990. 592 с.
- Диагностика и лечение ожогов в лечебных учреждениях Вооруженных Сил. Метод. рекомендации. – М.: Воениздат. 1992. 5 с.
- Справочник по клиническим и лабораторным методам исследования. Под ред. Е.А. Кост. М.: Медицина. 1968. 436 с.
- Бонд В., Флиднер Т., Аршамбо Д. Радиационная гибель млекопитающих. Нарушение кинетики клеточных популяций. Пер. с англ. – М.: Атомиздат. 1971. 316 с.
- 20. Liu X., Liu J.Z., Zhang E. et al. Impaired wound healing after local soft X-ray irradiation in rat skin: time course study of pathology. proliferation. cell cycle. and apoptosis // J. Trauma. 2005. Vol. 59. № 3. P. 682–690. Поступила:18.12.2015

Принята к публикации 12.02.2016