

ИССЛЕДОВАНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ В КРОВИ НА γ -ОБЛУЧЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОК ИММУННОЙ СЕТИ

Морозова Г.И.¹, Муньос М.М.¹, Иванов А.В.², Кулинич Т.М.², Романов С.А.³

¹ Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ, e-mail: gimorozova@mail.ru

² ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии МЗ РФ

ул. Профсоюзная, 86, г. Москва, 117837, РФ

³ ООО «ONTEGRA»

2-я ул. Энтузиастов, 5, корп. 4, г. Москва, 111024, РФ

Поступила в редакцию 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0637

Аннотация. Биофизический контроль радиационного воздействия на человека в зонах ядерных реакторов, в условиях космического полета, а также при проведении лучевой терапии на сегодня является актуальным. В связи с этим в данной работе решались следующие задачи: 1) исследование реакций лейкоцитов в крови после однократного воздействия γ -излучения ^{60}Co на кровь *in vitro*; 2) математическое моделирование быстрых иммунных ответов на облучение на основе энергетических показателей клеток в крови. С помощью люминесцентного микроскопа распознавали и исследовали лимфоциты и нейтрофилы в мазках донорской венозной крови, витально окрашенной катионным зондом 4-(*n*-диметиламинстирил)-1-метилпиридинием (ДСМ). Энергетическую активность клеток (ЭА) в каждой популяции характеризовали суммой трансмембранных потенциалов (ТМП) на внешней и митохондриальной мембранах, и оценивали по интенсивности и цвету флуоресценции ДСМ в митохондриях и ядрах клеток. Доза-зависимые эффекты γ -облучения оценивали на основе данных компьютерного анализа цифровых флуоресцентных изображений клеток. В экспериментах установлено, что изменение ТМП лейкоцитов после γ -облучения крови в дозах 1Гр-5Гр зависит от исходной ЭА клеток. Выявлена S-образная дозовая зависимость для ЭА облученных лимфоцитов. Наибольший эффект деэнергизации клеток обнаружен после облучения крови в дозе 4Гр. Предложена модель T-зависимых иммунных реакций в виде системы нелинейных дифференциальных уравнений до и после облучения крови, где концентрации для пяти популяций клеток заменены на флуоресцентные переменные, которые отражают количество активных митохондрий в каждой популяции. Такая модель адекватна для описания быстрой фазы иммунного ответа после одноударного радиоактивного облучения организма.

Ключевые слова: γ -облучение крови, нейтрофилы, лимфоциты, мембранный потенциал, активность митохондрий, флуоресцентный зонд ДСМ, энергетические показатели, модель иммунитета.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время радиобиологические исследования приобретают всё большую актуальность в связи с необходимостью контроля за радиационной безопасностью в зонах расположения атомных реакторов, в условиях космического полета, а также в связи с использованием радиоактивных материалов в науке и в медицине. Все это обусловило необходимость изучения эффектов низкоинтенсивного хронического облучения и однократных радиационных воздействий на организм. В результате этих исследований был выявлен нелинейный характер зависимости радиобиологических эффектов от дозы радиации, открыта повышенная чувствительность млекопитающих к малым дозам радиации, установлено, что повреждение важных систем организма – кроветворной (гемопозза) и иммунной, определяют течение лучевой болезни и возникновение отдаленных последствий облучения [1,2]. В связи с этим актуально использование биологически мотивированных математических моделей на основе параметров, позволяющих установить причинно-следственные связи между формированием радиобиологических эффектов на различных уровнях биологической организации.

Кровь является информативным и удобным тест-объектом для исследования и моделирования динамики кооперативных иммунных реакций на фоне воздействий, в том числе радиационного облучения (РО). В ряде экспериментов установлено, что зрелые (дифференцированные) клетки, как правило, весьма резистентны к острому одноударному γ -облучению, когда не происходит их последующая гибель через сутки и более [1]. В то же время в других исследованиях *in vitro* [2] после γ -облучения крови уже при дозе 1Гр обнаружена общая тенденция к росту относительной доли мононуклеаров с повышенным синтезом внутриклеточной формы ИЛ-1, ФНО или ИЛ-4, регулирующих апоптоз.

С другой стороны, клетки крови как периферическое звено иммунной сети, являются естественными датчиками, которые могут сигнализировать о характере и степени внешнего воздействия по быстрым изменениям в мембранах и митохондриях. В биофизических и биохимических исследованиях выявлена ключевая роль перекисного окисления липидов (ПОЛ) в деактивации транспортных АТФ-аз в мембранных каналах,

деэнергизации митохондрий (снижения протонного потенциала), снижение $\Delta\phi$ на плазматической мембране клеток [3]. Установлено, что ПОЛ является важным фактором, запускающим цепь быстрых изменений ионного гомеостаза в клетках, причём, эти процессы могут быть тесно связаны с влиянием радиации на гемоглобин эритроцитов и на их способность переносить кислород [4]. В результате в крови может происходить закисление, которое влияет на транспорт ионов через клеточные мембраны и на энергетику митохондрий.

В свете выше изложенного целесообразно применение биофизических методов, позволяющих исследовать изменение мембранных и энергетических характеристик лейкоцитов крови после острого РО. В серии работ показаны универсальные возможности флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда ДСМ⁺[4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния] [5] как цветного флуорохрома для визуализации мембран митохондриального ретикулума и ядерных структур в живых клетках и как молекулярного инструмента для оценки структурно-энергетического статуса клеток [5-13]. В соответствии с теорией Нернста перераспределение катионов ДСМ между митохондриями, цитоплазмой и ядром в клетках определяется соотношением суммы отрицательных трансмембранных потенциалов (ТМП) на внешней и митохондриальной мембранах и положительного ТМП на ядерной мембране [7,12,14,15]. С помощью ДСМ установлено, что лимфоциты и нейтрофилы закономерным образом изменяют их ТМП и митохондриальную активность в ответ на различные физико-химические воздействия, в частности, на электромагнитные облучения [8,9].

На основе разработанных ранее флуоресцентных методик с зондом ДСМ имеется возможность исследовать энергетические состояния иммунных клеток разных типов и оценивать величины их ТМП непосредственно в цельной нативной крови при воздействиях *in vitro* или *in vivo* [6,11,16].

С другой стороны, математическое моделирование иммунных реакций на РО должно иметь практическую направленность, связанную с возможностью регистрации динамики структурно-энергетического баланса различных клеточных звеньев одновременно в одном и том же образце крови. Энергетические показатели иммунных клеток в нативной крови перспективны как экспериментальная основа для моделирования различных фаз иммунного ответа при внешних воздействиях. В связи с этим был предложен энергетический подход к описанию клеточно-гуморального иммунитета на основе перехода от концентраций клеток в популяциях к их энергетическим показателям, сопряженным с активностью митохондрий в системе нелинейных дифференциальных уравнений иммунной сети [16,17].

В свете вышеизложенного целью данной работы является исследование влияния разных доз однократного γ -облучения крови *in vitro* на энергетику и ТМП лимфоцитов и нейтрофилов в крови, а также применение энергетического подхода для построения модели быстрых фаз реакций иммунных клеток на одноударное γ -облучение.

ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проведена серия экспериментов по γ -облучению образцов венозной донорской крови (7 доноров). Забор крови делали из локтевой вены доноров в пробирку с цитратом. Пробы крови переносили микропипетками в конусные пробирки (Eppendorf объёмом 1,5 мл) по 100 мкл. Облучение пробирок с кровью производили радиоактивным элементом ⁶⁰Co с помощью гамма-терапевтической установки Рокус-М (перпендикулярно к оси пробирки, расположенной горизонтально) при разных дозовых (D) режимах облучения (D = NT = 1, 2, 3, 4 Гр), где мощность N=112 рентген/мин, T–время облучения образца. Контрольные и облученные образцы крови последовательно выдерживали в термостате при 37°C с экспозицией 2 часа каждый.

Для исследований использовали флуоресцентный зонд ДСМ [5], синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии. Флуорохромирование клеток крови производили путем добавления физиологического раствора с ДСМ в пробирку с кровью до его конечных концентраций 25 мкМ с последующим перемешиванием и инкубацией в термостате при 37° С с экспозицией 30 мин. Все инкубации и исследования соответствующих контрольных и опытных образцов крови проводили последовательно с временным интервалом 15-20 мин. Мазки витально окрашенной крови приготавливали способом раздавленной капли (на стекле) и затем исследовали на люминесцентном микроскопе Люмам-И2 (ЛОМО) в свете флуоресценции ДСМ. Режим возбуждения и регистрации флуоресценции ДСМ в клетках крови аналогичен режиму в предыдущих экспериментах [6,11]. Для каждого образца исследовали массивы по 100 лейкоцитов (нейтрофилов и лимфоцитов). Получали фотоизображения клеток с помощью цветной цифровой видеокамеры (Sony), закрепленной на специальном тубусе микроскопа. Анализ изображений лейкоцитов производили по показателям интенсивности и цвета флуоресценции ДСМ в митохондриях, и ядрах, как визуально (в мазке крови под микроскопом по аналогии с [11]), так и на компьютере с помощью стандартного и модифицированного программного обеспечения на основе обучающих выборок, полученных ранее в серии экспериментов на клетках с ДСМ [5-7,10,11,13]. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту [18]. Полученные результаты представляли в виде двух типов гистограмм для распределения нейтрофилов и лимфоцитов по значениям суммы ТМП ($\Delta\phi$) в 4-х диапазонах калиброванных потенциалов согласно [6,7,10,11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент. Люминесцентно-микроскопические исследования показали, что в контрольных препаратах крови при выбранной рабочей концентрации ДСМ (25мкМ), в норме распознаются лимфоциты с жёлтой или

желто-зеленой флуоресценцией активных митохондрий, образующие компактные или цепочечные структуры, с очень слабой флуоресценцией в ядрах, а также нейтрофилы с ярко-оранжевыми сегментами ядер и с зелено-желтой цитоплазмой с единичными митохондриями.

На рисунке 1 представлены фотографии нативной крови, где видны лимфоциты и нейтрофилы в свете флуоресценции зонда ДСМ: а – контрольные клетки, б – клетки в крови облученной дозой 5 Гр. Как можно видеть, в облученных лимфоцитах снижена флуоресценция в митохондриях, а внутри облученного нейтрофила резко снижена флуоресценция в ядрах, активных митондрий мало, но видны скопления крупных ярко-желтых гранул – бактерий, сохраняющих активность и мембранный потенциал. Из анализа наших наблюдений следует, что деполаризация нейтрофилов коррелирует со снижением их способности лизировать инфекцию, что может влиять на продуцирование ими Ia –антигенного белка и интерлейкинов [1,2,19,20].

Согласно хемоосмотической теории энергетический статус аэробных клеток прямо сопряжён с уровнем протонного потенциала на мембранах митохондрий [21]. При дезэнергизации митохондрий (в т.ч. в случае перекрашивания клеток зондом ДСМ) происходит перераспределение катионов зонда между митохондриями и ядром, катионы ДСМ проникают в ядро и связываются с отрицательными фосфатными группами полимеров [5,7]. Цвет флуоресценции зонда в митохондриях лимфоцитов может изменяться от ярко-жёлтого до бледно-зеленого в зависимости от их энергетического состояния и уровня суммы отрицательных ТМП [5-7]. Наблюдаемая оранжевая флуоресценция ДСМ в ядрах контрольных клеток возникает при достижении избыточной концентрации зонда внутри митохондрий (свыше предела его растворимости в воде 1 мМ), что характерно для исходно гиперактивных клеток с высоким уровнем протонного потенциала на мембранах митохондрий [8,9,12]. Важно отметить, что в норме нейтрофилы крови имеют на внешней мембране отрицательный ТМП на |60| мВ, в среднем, выше, чем у лимфоцитов [6]. Поэтому в соответствии с теорией Нернста при рабочей концентрации ДСМ более 10 мкМ, оптимальной для лимфоцитов, нейтрофилы оказываются перекрашенными и с ярко-оранжевыми ядрами. Однако, при этом сохраняется прямая корреляция между фагоцитарной активностью и интенсивностью флуоресценции ДСМ в цитоплазме и в ядрах нейтрофилов, сопряженной прежде всего с уровнем внешнего ТМП, поддерживаемого гликолизом в этих клетках [6,17]. В принципе в соответствии с электродиффузной теорией для адекватного окрашивания нейтрофилов можно использовать концентрацию зонда в 10 раз меньше (порядка 2мкМ), но тогда часть слабых лимфоцитов с низкими ТМП за выбранное время инкубации с ДСМ, оказываются не докрашенными с очень слабой флуоресценцией. Таким образом, особенности изображений лейкоцитов в свете флуоресценции ДСМ отражают разные энергетические состояния клеток и разные уровни отрицательных градиентов электрических полей (ТМП) на внешней и митохондриальных мембранах [7].

На основании полученных в предыдущих экспериментах с зондом ДСМ калибровочных данных [6,7,14], энергетический статус лимфоцитов и нейтрофилов в крови можно охарактеризовать их распределением по четырем диапазонам суммы ТМП на плазматической (φ_n) и митохондриальной ($\varphi_{мх}$) мембранах: $\Delta\varphi = (\varphi_n + \varphi_{мх})$, представленных в таблице 1.

На рисунке 2 представлены гистограммы распределения популяций лимфоцитов и нейтрофилов в контрольных (К) и опытных препаратах крови соответственно по четырём диапазонам $\Delta\varphi$ (соответственно табл. 1). Как можно видеть, после облучения крови дозами 1–2 Гр, наблюдается некоторый рост пулов лейкоцитов с высокими значениями потенциалов в диапазонах $\Delta\varphi_3$ и $\Delta\varphi_4$, однако, у части нейтрофилов происходит их снижение. Максимумы гистограмм для лимфоцитов сдвигаются вправо в сторону высоких ТМП. Напротив, при облучении дозами 4–5 Гр максимумы гистограмм сдвигаются в сторону меньших потенциалов,

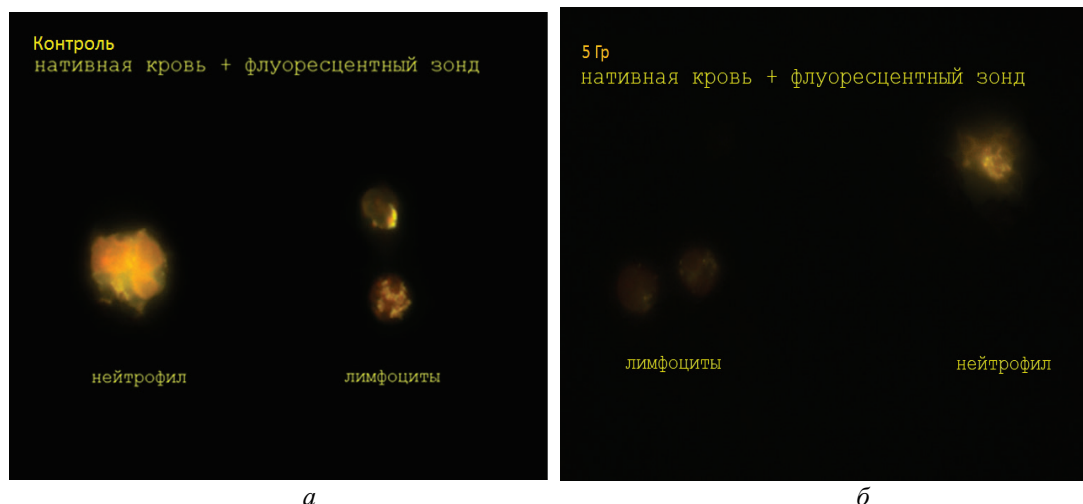


Рисунок 1. Кровь в свете флуоресценции ДСМ: а (без облучения) - гиперактивный нейтрофил и активные лимфоциты с желтыми энергизированными митохондриями; б (после γ -облучения крови): слабоактивные лимфоциты и деполаризованный нейтрофиле, в котором видны активные бактерии. Об. 90 x МИ. Масштаб \leftrightarrow 5мкм

Таблица 1. Калибровочные диапазоны ТМП ($\Delta\varphi$) для лейкоцитов

$\Delta\varphi = \varphi_{\text{п}} + \varphi_{\text{мх}}$ mv	$\Delta\varphi_1$	$\Delta\varphi_2$	$\Delta\varphi_3$	$\Delta\varphi_4$
лимфоциты	< 60	60 - 150	160 - 230	230 - 280
нейтрофилы	< 120	120 -180	190 - 250	260 - 320

особенно для нейтрофилов. Наибольший эффект снижения энергетики клеток характерен для лимфоцитов после облучения дозой 4 Гр.

На рисунке 3 представлен результат статистического обобщения полученных данных, в том числе на основе анализа цифровых изображений клеток крови в свете флуоресценции ДСМ в контролях (К) и после γ -облучения разными дозами. Выявлена общая закономерность в реакциях клеток на облучение крови, наиболее характерная для популяции лимфоцитов: S-образная доза-зависимость изменения доли клеток с гипервысокой ($\Delta N_{\text{гэ}}$) и низкой энергетической активностью ($\Delta N_{\text{дэ}}$). Интересно, что больший эффект снижения пула лимфоцитов с высокими ТМП даёт облучение дозой 4 Гр, а не 5 Гр. Полученные результаты свидетельствуют в пользу кооперативного характера взаимодействия между субпопуляциями лимфоцитов и нейтрофилами, например, через интерлейкины с противоположными активностями, что, по-видимому, имеет адаптивное и регуляторное значение на ранней фазе энергетической реакции лимфоцитов на облучение, когда численность клеток в крови ещё близка к стационарной [2,19,20].

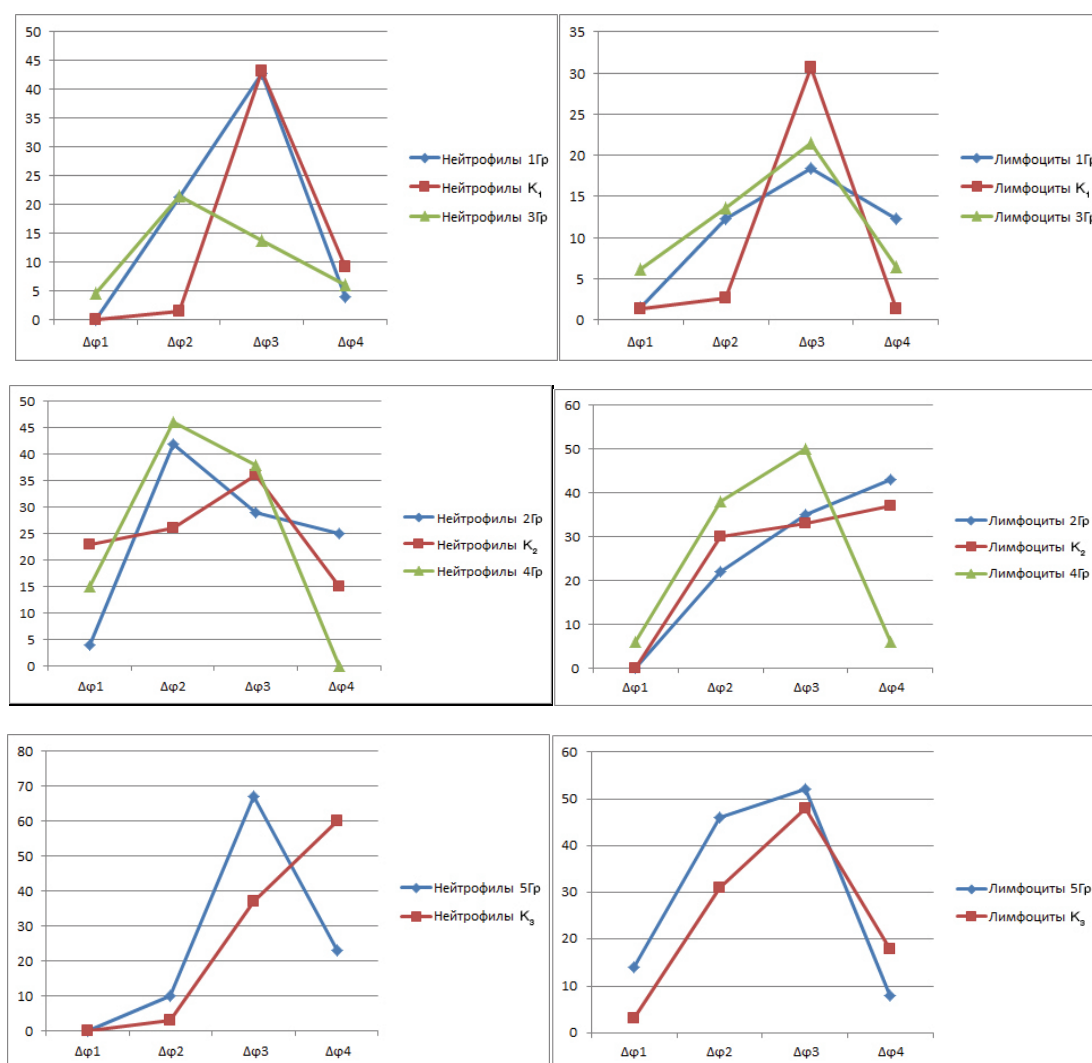


Рисунок 2. Гистограммы распределения лейкоцитов в крови по значениям суммы ТМП ($\Delta\varphi_i$) на плазматической ($\Delta\varphi_{\text{п}}$) и митохондриальной ($\Delta\varphi_{\text{мх}}$) мембранах: $\Delta\varphi_i = \Delta\varphi_{\text{п}} + \Delta\varphi_{\text{мх}}$, до и после их γ -облучения *in vitro* дозами от 1 до 5 Гр ($i = 1,2,3,4$ согласно таблице 1). По оси ординат - % клеток). Представлены данные для крови от трёх доноров соответственно контролям K_1, K_2, K_3 . Погрешность: $\pm 0, 5\%$

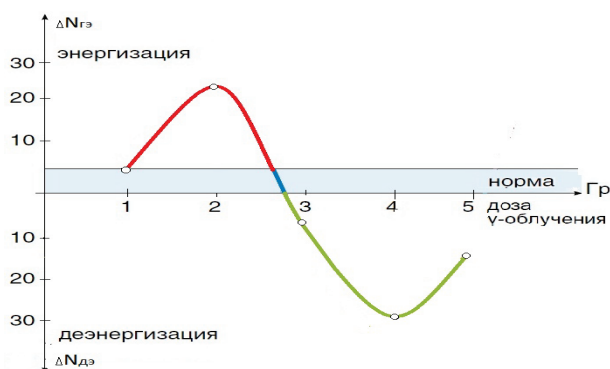


Рисунок 3. Обобщение доза-зависимой энергетической реакции лимфоцитов в донорской крови после γ -облучения. По оси ординат – изменение доли лимфоцитов (%) с высокой ($\Delta N_{гэ}$) и низкой ($\Delta N_{дэ}$) энергетической активностью.

Из сопоставления полученных данных можно заключить, что определённые пулы клеток крови в популяциях лимфоцитов и нейтрофилов могут иметь разную чувствительность к острому γ -облучению, сопряженную с их исходной энергетической активностью. Наиболее чувствительны к одноударному облучению нейтрофилы с незавершенным фагоцитозом. Обнаружена активация бактерий внутри ослабленных нейтрофилов через 2 ч после γ -облучения и выход части инфекции в кровь. В результате может происходить переактивация устойчивых к облучению нейтрофилов с последующей активацией Т-лимфоцитов. В то же время нельзя исключить активацию, например, естественных киллеров (ЕК), которые способны непосредственно уничтожать инфекцию в крови. Таким образом выявленный эффект опосредованной стимуляции части клеток в популяции лимфоцитов может быть обусловлен ростом антигенного инфекционного фона за счёт ослабления нейтрофилов, наиболее чувствительных к γ -облучению.

Модель. В течение последних трёх десятилетий методы математического моделирования использовали для исследования широкого спектра иммунологических процессов и явлений. Большой вклад в развитие этого направления внесли Г.И. Марчук и его ученики [22-24]. В основе этих моделей лежит популяционная модель Вольтерри-Лотки. Все эти модели можно разделить на два основных подкласса:

- I – модели, описывающие сетевые взаимодействия В-клеток и антител
- II – модели иммунной сети с учетом В-Т кооперации.

В общем случае динамика иммунных клеток разных популяций в крови на острое облучение организма сопряжена со снижением числа делящихся клеток в костном мозге – предшественников определенных линий клеточного иммунитета, т.е. обусловлена повреждением системы гемопоэза. В работах Н.В. Степановой и О.А. Смирновой была предложена математическая модель типа I для описания гуморального иммунного ответа на Т-независимый антиген у необлученных и облученных млекопитающих, основанной на клонально-селекционной теории Ф. Бернета и экспериментальных данных [1].

В нашем случае реакции лейкоцитов в крови до и после одноударного гамма-облучения *in vitro*, будем рассматриваем в рамках модели типа II как клеточно-гуморальный ответ с участием взаимодействий нейтрофилов (НФ) с Т-хелперами (Тх), между субпопуляциями Т-лимфоцитов (Тл) и В-лимфоцитов (Вл) (с запаздыванием) по аналогии с моделью Шишкина В.И. с соавторами [24]. Предлагаемая в данной работе общая модель учитывает следующие основные взаимодействия:

- НФ-ов и естественных киллеров (ЕК) с инфекцией (V_i),
- между Т-хелперами, Т-супрессорами и В-лимфоцитами,
- реакцию антиген (C_g) -антитело (C_a).

В случае пролонгированных (медленных) фаз иммунных реакций в уравнениях учитываются времена запаздываний (в процессах синтеза антител или лимфокинов, пролиферации под действием антигена, гибели в процессе апоптоза).

Тогда для реакций в необлученной крови система уравнений будет иметь вид:

$$\frac{dC_{НФ}}{dt} = k_1 C_{НФ} - \sigma_{1a} F_{НФ}(t - t_a) V_i(t - t_a) - \gamma_1 C_{НФ}$$

$$\frac{dC_{НФ}}{dt} = k_1 C_{НФ} + \chi_{1v} C_{НФ} V_i - \gamma_1 C_{НФ} \quad (1)$$

$$\frac{dC_{ТХ}}{dt} = k_3 C_{ТХ} - \chi_{34} C_{ТС} C_{ТХ} + \chi_{31} C_{НФ} C_{ТХ} - \gamma_3 C_{ТХ}$$

$$\frac{dC_B}{dt} = k_2 C_B + C_B (\chi_{21} C_{НФ} + \chi_{23} C_{ТХ}) + \alpha_m C_B C_g(t - t_m) \theta(t - t_m - \chi_{2g}) C_B(t - t_d) C_g(t - t_d) - \gamma_2 C_B$$

$$\frac{dC_a}{dt} = \alpha_{\text{ПЛr}} C_{\text{ПЛ}}(t - t_r) C_g(t - t_r) \theta(t - t_r) - \omega_{ga} C_a C_g - \gamma_a C_a$$

$$\frac{dC_{EK}}{dt} = k_5 C_{EK} + \alpha_K C_{EK} V_i - \gamma_5 C_{EK}$$

$$\frac{dC_{TC}}{dt} = k_4 C_{TC} + \alpha_c C_{TC}(t - t_c) C_g(t - t_c) - \chi_{43} C_{TC} C_{TX} - \gamma_4 C_{TC}$$

$$\frac{dC_g}{dt} = k_0 C_g - \omega_{ga} C_a C_g - \gamma_g C_g$$

$$\frac{dV_i}{dt} = k_v V_i \left(1 - \frac{V_i}{V_{max}}\right) - f_v V_i (C_{H\Phi} + C_{EK}) - \gamma_v V_i$$

где $C_{\text{ПЛ}}$ – концентрация плазматических клеток через время t_r

На основе нового метода цитознергетического анализа крови [6,7,11] можно получить данные об изменении количества и качества (энергетики) клеток, как в популяции НФ, так и в четырёх субпопуляциях лимфоцитов. Поэтому целесообразно преобразовать нашу исходную модель с помощью энергетических показателей клеток. Исходя из принципа биологического эпиморфизма между функциональной активностью клеток и активностью их митохондрий, заменим переменную для концентраций клеток $C_j(t)$ в системе уравнений (1) концентрациями активных митохондрий для каждой клеточной субпопуляции. С этой целью введем некоторые определения и соответственно преобразуем систему уравнений (1).

В качестве переменной сначала рассмотрим митохондриальный показатель M_j , который характеризует изменение среднего числа активных митохондрий в каждой популяции клеток на разных фазах иммунного ответа. По определению

$$M_j = m_j C_j, \tag{2}$$

где m_j – среднее число активных митохондрий на клетку в j -ой популяции, C_j – концентрация этих клеток в крови. В соответствии с теорией взаимодействия катионов ДСМ с митохондриями [5-7].

$$M_j(t) = b F_{ij}(t) C_j(t), \tag{3}$$

где b – приборная константа, F_i – средняя интенсивность флуоресценции ДСМ в митохондриях одной клетки j -ой популяции, C_j – концентрация клеток j -й популяции в крови.

Замена переменной C_j на M_j расширяет возможности моделирования иммунного ответа, так как в зависимости от выбранного интервала времени можно получать упрощённые варианты модели. Если время

Таблица 2. Обозначения констант в уравнениях

k_j	константа скорости пополнений клеточной популяции (из стволовых клеток или клеток-предшественников) или размножения инфекции
χ_{ij}	константа скорости изменения активности клеток (потенциалов) при взаимодействии двух популяций
χ_{ig}	константа скорости дифференцировки клеток в популяции
α_j	константа скорости процесса пролиферации клеток в популяции (или сигнальной энергизации) под действием антигена
γ_j	константа естественной смерти клеток (необратимой дезэнергизации) в популяции
σ_{ig}	константа скорости гибели (или полной дезэнергизации) клеток в популяции путём апоптоза при взаимодействии с инфекцией
q	константа скорости активации клеток в популяции под влиянием энергоресурсов среды крови
t_d	время запаздывания в процессе дифференцировки клеточной популяции

исследуемой фазы иммунных реакций много меньше времени жизни клеток, то в правой части оставляем только члены, сопряженные с первичными быстрыми энергетическими реакциями и, наоборот, пренебрегаем эффектами изменения энергетики клеток на поздних фазах иммунного ответа, когда существенно изменяется именно соотношение клеток в популяциях (сутки и более).

Экспериментальные результаты этой работы и предыдущих исследований, свидетельствуют, что эффективными факторами быстрой фазы активации лимфоцитов в крови является не столько антигенная стимуляция, сколько стимуляция клеток опсонинами, интерлейкинами и другими биологически активными факторами [6]. Показано, что есть прямая корреляция между увеличением числа энергизированных митохондрий и интенсивности флуоресценции ДСМ в митохондриях в течение 30 мин после стимуляции лимфоцитов эритропоэтином [13].

Исходя из этого, систему (1) преобразуем следующим образом:

- заменим переменные $C_j(t)$ на интенсивность флуоресценции зонда для клеток каждой популяции (F_j)
- исключим из уравнений члены для клеток-предшественников и плазматических клеток.

Тогда переход к **флуоресцентным энергетическим переменным** в системы (1) для каждой j -й популяции клеток будет следующий:

$$C_j(t) \rightarrow F_j(t) = m_i(t)F_i(t) C_j \quad (4)$$

Из результатов наших исследований следует, что первичная реакция лейкоцитов на острое γ -облучение крови *in vitro* обусловлена прежде всего изменением их ТМП и митохондриальной активности. При этом показатель энергетического статуса клеток (F_i) зависит от изменения их метаболизма и реакций мембран, которые в свою очередь зависят от биохимического состояния среды крови. Поэтому с целью моделирования быстрой фазы иммунных реакций концентрации клеток в системе (1) заменим на их энергетические показатели в виде флуоресцентных переменных $F_i(t)$, которые можно измерять в крови. Введем q_i - постоянный коэффициент скорости поддержания энергетики клеток и ионного гомеостаза для каждой популяции энергоресурсом среды.

Используя соотношение перехода (4), преобразуем систему уравнений (1) в систему с флуоресцентными переменными, где t много меньше времени жизни клеток:

$$\frac{dF_{H\Phi}}{dt} = q_1F_{H\Phi} + \chi_{1V}F_{H\Phi}V_i - \gamma_1F_{H\Phi} \quad (5)$$

$$\frac{dF_{H\Phi}}{dt} = q_1F_{H\Phi} - \chi_{1V}F_{H\Phi}V_i - \sigma_{1a}F_{H\Phi}(t - t_a)V_i(t - t_a) - \gamma_1F_{H\Phi}$$

$$\frac{dF_{TX}}{dt} = q_3F_{TX} - \chi_{34}F_{TX}F_{TC} + \alpha_XF_{TX}(t)C_g(t) + \chi_{23}F_{TX}(t)F_{H\Phi}(t) - \gamma_3F_{TX}$$

$$\frac{dF_B}{dt} = q_2F_B + \chi_{23}F_BF_{TX} + \alpha_BF_B(t)C_g(t) - \gamma_2F_B$$

$$\frac{dF_{TC}}{dt} = q_4F_{TC} - \chi_{43}F_{TC}F_{TX} + \alpha_CF_{TC}(t)C_g(t) + \chi_{41}F_{H\Phi}(t)F_{TC}(t) - \gamma_4F_{TC}$$

$$\frac{dF_{EK}}{dt} = q_5F_{EK} + \chi_{5V}F_{EK}(V_i) - \sigma_{5a}F_{EK}(t)(V_i) - \gamma_5F_{EK}$$

$$\frac{dC_g}{dt} = k_0C_g - \gamma_gC_g$$

$$\frac{dV_i}{dt} = k_VV_i(t) \left(1 - \frac{V_i}{V_{max}}\right) - f_VV_i(F_{H\Phi} + F_{EK}) - \gamma_VV_i$$

В каждом интервале времени t члены уравнений с коэффициентами α_j здесь отражают первичную сигнальную фазу за счет прямого взаимодействия антигена в среде с мембранами лимфоцитов, что приводит к быстрой стимуляции митохондрий и соответственно к росту F_i в клетках. Систему уравнений (5) в принципе можно использовать для моделирования быстрой фазы реакции популяций лейкоцитов после γ -облучения, если уровень антигенного фактора задан ($C_g = \text{const}$), а титр антител определяется стандартным способом.

Будем считать, что до облучения свободная активная инфекция в крови отсутствует: $V_i(0) = 0$, но некоторый антигенный фон сохраняется и постоянен, новые антитела не продуцируются. Если кровь исследуют через время менее четырех часов после облучения, то концентрации иммунных клеток близки к стационарным.

Введем в уравнения системы (5) линейные члены с параметрами облучения, отражающие прямое влияние радиации на энергетику митохондрий и ТМП в каждой популяции клеток крови.

Тогда при $dC_j/dt = 0$, $C_g = \text{const}$. получим достаточно однородную систему уравнений для флуоресцентных энергетических переменных иммунных клеток в пяти популяциях при заданных параметрах облучения:

$$\frac{dF_{H\Phi}}{dt} = q_1F_{H\Phi} - \gamma_1F_{H\Phi} - \frac{N}{D_{H\Phi}^0}F_{H\Phi} \quad (6)$$

$$\frac{F_{TX}}{dt} = q_3 F_{TX} - \chi_{13} F_{TX} F_{H\Phi} - \chi_{34} F_{TX} F_{TC} - \gamma_4 F_{TC} - \frac{N}{D_{TX}^0} F_{TX}$$

$$\frac{F_B}{dt} = q_2 F_B + \chi_{23} F_B F_{TX} - \gamma_2 F_B - \frac{N}{D_B^0} F_B$$

$$\frac{F_{TC}}{dt} = q_4 F_{TC} + \chi_{41} F_{H\Phi}(t) F_{TC}(t) - \chi_{43} F_{TC} F_{TX} - \gamma_4 F_{TC} - \frac{N}{D_{TC}^0} F_{TC}$$

$$\frac{F_{EK}}{dt} = q_5 F_{EK} - \gamma_5 F_{EK} - \frac{N}{D_{EK}^0} F_{EK}$$

где $\frac{N}{D_j^0}$ – удельные скорости перехода клеток j -ой популяции из неповреждённого состояния в умеренно повреждённое со сниженной энергетикой митохондрий и уровней ТМП.

Полученная система уравнений моделирует относительно быструю фазу энерго-сопряжённых реакций в популяциях лейкоцитов после одноударного γ -облучения крови *in vitro*. Результат этих взаимодействий, как системы реакций с обратными связями [1,2], может приводить к колебательному режиму значений флуоресцентного показателя F_i в лимфоцитах разных типов. Кроме того, по нашим данным, в процессе деполаризации части нейтрофилов может происходить процесс активации захваченных ими бактерий и выход инфекции в кровь. Далее возможна иммунная активация лимфоцитов в крови [2,20]. Таким образом, может запуститься как бы новый каскад иммунных реакций, эффективность которых далее зависит от дозы облучения, исходного состояния иммунных клеток и их чувствительности к воздействию. Такой процесс может являться причиной дальнейшего волнообразного характера изменения активности взаимодействующих клеток в крови [2,11, 20].

Предлагаемая здесь модель в виде системы нелинейных дифференциальных уравнений с энергетическими переменными (6) вполне адекватна и для описания ранней быстрой фазы ответа клеток иммунной сети после острого радиационного облучения организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о различном влиянии одноударного γ -облучения крови в системе *in vitro* на энергетику митохондрий и ТМП в лейкоцитах в зависимости от их исходного энергетического состояния и указывают на кооперативный характер иммунных реакций клеточных популяций в диапазоне радиоактивных доз 1–5 Гр, при этом возможно выявить и активацию инфекционного фона при ослаблении активности нейтрофилов. Исследование динамики энергетических показателей клеточного иммунитета после γ -облучения актуально в плане выяснения механизмов защитной адаптации организма к радиационному облучению и для поиска эффективных радиопротекторов. Моделирование каскада медленных и быстрых иммунных реакций клеточных популяций в крови на основе измеряемых их энергетических переменных, перспективны с целью создания алгоритмов системной диагностики и управления динамикой иммунного ответа, например, в ходе лучевой терапии.

Список литературы / References:

- Смирнова О.А. *Радиация и организм млекопитающих: модельный подход*. Москва-Ижевск: 2006, 223 с. [Smirnova O.A. *Radiation and mammalian organism: model approach*. Moscow-Izhevsk: 2006, 223 p. (In Russ.)].
- Тимошевский А.А., Пиголин Ю.И., Гребенюк А.Н. Использование иммунологических показателей периферической крови при проведении судебно-медицинской экспертизы лиц, подвергшихся радиационному воздействию. *Судебно-медицинская экспертиза*, 2013, № 1, с. 17-20 [Timoshevsky A.A., Pigolkin Yu.I., Grebenyuk A.N. The use of immunological characteristics of the peripheral blood for the purpose of forensic medical expertise of the subjects exposed to ionizing radiation. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*, 2013, no. 1, pp. 17-20 (In Russ.)].
- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М.: Наука, 1972, 252 с. [Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. *Lipid peroxidation in biological membranes*. Moscow: Nauka, 1972, 252 p. (In Russ.)].
- Иржик Л.И. *Гемоглобины и их свойства*. М.: Наука, 1975, 239 с. [Irzhik L.I. *Hemoglobins and their properties*. M.: Nauka, 1975, 239 p. (In Russ.)].
- Морозова Г.И., Добрецов Г.Е., Дубуре Р.Р., Дубур Г.Я., Голицын В.М., Владимиров Ю.А. Флуоресценция зонда 4-(n -диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке. *Цитология*, 1981, т. 23, № 8, с. 916-923 [Morozova G.I., Dobretsov G.E., Dubur R.R., Dubur G.Ya., Golitsyn V.M., Vladimirov Yu.A. Fluorescence of 4-(n -dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium probe in a living cell. *Cytology*, 1981, vol. 23, no. 8, pp. 916-923 (In Russ.)].
- Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И.Г., Коробкова Е. Н., Полосина О.В., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценки физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ: клиника и эксперимент. *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 3, с. 43-47 [Morozova G.I., Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Baziyeva F. H., Baukina O.V. Microfluorimetric identification and assessment of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood by means

of fluorescent probe-cation DSM: clinical and experimental data. *Gematal. Transfuziol.*, 1997, vol. 42, no. 3, pp. 43-47 (In Russ.).

7. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И., Лихачева Л.М., Айдыралиев Р.К., Владимиров Ю.А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда - катиона ДСМ на цитоплазматической и митохондриальной мембранах. *Биологические мембраны*, 1986, т. 3, № 3, с. 266-273 [Dobretsov G.E., Kosnikov V.V., Morozova G.I., Likhacheva L.M., Aidaraliev R.K., Vladimirov Yu.A. Measurement of the concentration gradient of the fluorescent probe - cation DSM on the cytoplasmic and mitochondrial membranes. *Biological membranes*, 1986, vol. 3, no. 3, pp. 266 -273 (In Russ.)].

8. Розенко Л.Я., Тарнопольская О.В., Шихлярова А.И., Непомнящая Е.М., Крохмаль Ю.Н. Флуоресцентные показатели живых клеток опухоли плоского эпителия до и после химиолучевой терапии у больных плоскоклеточным раком полости рта. *Современные проблемы науки и образования*, 2013, № 6 [Rozenko L.Y., Tarnopolskaya O.V., Shikhlyarova A.I., Nepomnyaschaya E.M., Krokmal Y.N. Fluorescence indices of living squamous epithelium tumor cells before and after chemoradiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the cavity. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniy*, 2013, no. 6 (In Russ)].

9. Морозова Г.И., Корнилаева Г.В., Подчерняева Р.Я., Куленич Т.М., Боженко В.К. Исследование влияния КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на мембранные структуры в культуре Т-лимфобластидных клеток с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2014, № 11, с. 31-38 [Morozova G.I., Kornilaeva G.V., Podchernyaeva R.Ya., Kulenich T.M., Bozhenko V.K. Study of influence millimeter-wave EHF- irradiation on membrane structures of the T-lymphoblastoid cells culture using a fluorescent probe-cation DSM. *Biomedicine Radioengineering*, 2014, no. 11, pp. 31-38 (In Russ.)].

10. Морозова Г.И., Козлова М.А., Акшинцев А.А. Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 3, с. 428-424 [Morozova G.I., Kozlova M.A., Akshintsev A.A. Evaluation of the ecological toxicity of aqueous solutions with low xenobiotics doses on donor blood cells using a potential-sensitive fluorescent probe. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 428-424 (In Russ.)].

11. Акшинцев А.А., Морозова Г.И., Козлова М.А., Баренбойм Г.М. Выявление адаптогенного и защитного действия экстрактов из термофильных водорослей на энергетику лейкоцитов в нативной крови по флуоресценции потенциал - чувствительного зонда ДСМ. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 3, с. 536-542 [Akshintsev A.A., Morozova G.I., Kozlova M.A., Barenboim G.M. Detection of adaptogenic and protective effect of extracts from thermophilic algae on the energy of leukocytes in native blood by fluorescence potential-sensitive probe DSM. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 536-542 (In Russ.)].

12. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой. *Сборник научных трудов 2-го съезда биофизиков России*. М.: 1999, с. 256-257 [Morozova G. I., Poletaev A.I., Borschevskaya T.A. Inverted electrochemical potential on the nuclear membrane of cells and its relationship with cellular energy. *Reports of the 2nd Russia biophysicists Congress*. М.: 1999, pp. 256-257 (In Russ.)].

13. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating effect of erythropoietin on thy timocyte energetics established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria. *Biochem. Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2007, vol. 1, no. 4, pp. 325-330.

14. Askarova K.Z., Morozova G.I., Anoshin A.A. Modeling the Accumulation Kinetics of Anionic Photo-sensitizers in Tumor Cells with Different Trans-membrane Potentials. *J. Mech.Cont.& Math. Sci., Special Issue-1*, March, 2019, pp. 483-490.

15. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. *Физические механизмы функционирования биологических мембран*. М: МГУ, 1987, 187 с. [Tverdislov V.A., Tikhonov A.N., Yakovenko L.V. *Physical mechanisms of biological membranes functioning*. М: Moscow State University, 1987, 187 p. (In Russ.)].

16. Морозова Г.И., Аношин А.А., Добрецов Г.Е., Матвеева Н.К. Структурно-энергетический баланс иммунных клеток и тромбоцитов в нативной крови, определяемый с помощью флуоресцентного зонда ДСМ, как адекватная характеристика состояния организма. *Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России*, Краснодар: Кубанский ГУ, 2019, т. 2, с. 217-218 [Morozova G. I., Anoshin A. A., Dobretsov G.E., Matveeva N.K. Structure-energy balance of immune cells and platelets in native blood determined by fluorescent probe DSM as an adequate characteristic of the organism state. *Scientific Proceedings Collection of VI Russia Biophysicists Congress*, Krasnodar: Kuban State University, 2019, vol. 2, pp. 217-218 (In Russ.)].

17. Морозова Г.И., Аношин А.А., Оболонкова А.Н. Моделирование иммунной сети на основе структурно-энергетических параметров клеточных популяций. *Труды XVIII международной конференции*, Пушино: РАН, МКО, 2011, с. 110 [Morozova G.I., Anoshin A.A., Obolonkova A.N. Modeling of immune network on the basis of structural and energetic parameters of cell populations. *Proceedings of XVIII International Conference*, Pushchino: RAS, ICE, 2011, p. 110 (In Russ.)].

18. Бейли И.Н. *Статистические методы в биологии*. М.: Наука, 1963, 277с. [Bailey I.N. *Statistical methods in biology*. М.: Science, 1963, 277 p. (In Russ.)].

19. Бонд В., Флинднер Т.Б., Аршамбо Д. *Радиоационная гибель млекопитающих: Нарушение кинетики клеточных популяций*. М.: Атомиздат, 1971, 317 с. [Bond W., Flindner T.B., Archambault D. *Radiation death of mammals: Disturbance of kinetics of cell populations*. М.: Atomizdat, 1971, 317 p. (In Russ.)].

20. Петров Р.В. Роль гормонов и медиаторов в функционировании иммунной системы. *Вестник АМН СССР*, 1980, № 8, с. 3-11 [Petrov R.V. Role of hormones and mediators in functioning of immune system. *Bulletin of the USSR Medical Sciences Academy*, 1980, no. 8, pp. 3-11 (In Russ.)].
21. Скулачев В.П. *Энергетика биологических мембран*. М.: Наука, 1989, 123 с. [Skulachev V. P. *Energy of biological membranes*. М.: Science, 1989, 123 p. (In Russ.)].
22. *Математическое моделирование в иммунологии и медицине*. Под ред. Г.И. Марчука. Новосибирск: Наука, 1982, 110 с. [Mathematical modeling in immunology and medicine. Edited by G.I. Marchuk. Novosibirsk: Nauka, 1982, 110 p. (In Russ.)].
23. Бельих Л.Н. *Анализ математических моделей в иммунологии*. М.: Наука, 1988, 192 с. [Belykh L.N. *Analysis of mathematical models in immunology*. М.: Nauka, 1988, 192 p. (In Russ.)].
24. Шишкин В.И., Янченкова Е.Н. Математическая модель иммунной сети с учётом деления Т-клеток на субпопуляции. *Физическая механика*, 1998, с. 174-179 [Shishkin V.I., Yanchenkova E.N. Mathematical model of immune network taking into account division of T-cells into subpopulations. *Physical Mechanics*, 1998, pp. 174-179 (In Russ.)].

INVESTIGATION AND MODELING OF LEUKOCYTE RESPONSES IN THE BLOOD TO γ -IRRADIATION USING ENERGY PARAMETERS OF IMMUNE NETWORK CELLS

Morozova G.I.¹, Muny'os M.M.¹, Ivanov A.V.², Kulinich T.M.², Romanov S.A.³

¹ Russian Peoples' Friendship University,

st. Miklukho-Maklay, 6, Moscow, 117198, Russia, e-mail: gimorozova@mail.ru

² Russian Scientific Center of Roentgenradiology, Ministry of Health of Russia

st. Profsoyuznaya, 86, Moscow, 117837, Russia

³ LLC ONTEGRA,

Enthusiasts 2nd st., 5b4, Moscow, 111024, Russia

Received 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0637

Abstract. Biophysical control of radiation exposure to humans in the areas of nuclear reactors, in space flight conditions, as well as during radiation therapy, is relevant today. In this regard, the following tasks were solved in this work: 1) study of the leukocytes reactions in the blood after a single exposure to ^{60}Co γ -radiation on the blood in vitro; 2) mathematical modeling of the fast immune responses using energy indicators of cells. By use of the luminescent microscope, lymphocytes and neutrophils were recognized and examined in donor venous blood smears, vitally stained with a cationic probe 4-(n-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium (DSM). Cell energy activity (EA) in each population was characterized by the sum of transmembrane potentials (TMP) on the outer and mitochondrial membranes, which was assessed by DSM fluorescence intensity and color in cell mitochondria and nuclei. Dose-dependent γ -irradiation effects were evaluated on the basis of digital fluorescent images computer analysis. It was found in the experiments that the change in the TMP of after blood γ - irradiation in doses of 1Gy-5Gy depends on their initial EA. An S-shaped dose dependence was revealed for the irradiated lymphocytes energy activity. The greatest effect of cells energy decrease occurs after irradiation with 4 Gy dose. A model of T-dependent immune responses is proposed in the form a system of nonlinear differential equations before and after blood irradiation, where the concentrations for five cell populations are replaced by their fluorescent variables, which reflect the number of active mitochondria in each population. Such a model is also adequate for describing the rapid phase of the immune response after single-hit radiation exposure of the body.

Key words: blood γ -irradiation, neutrophils, lymphocytes, membrane potential, mitochondria activity, fluorescent probe DSM, energy parameters, immunity model.