

Вплив низькоінтенсивного гамма-випромінення на хемілюмінесценцію сироватки крові щурів при хронічному запаленні

М.О. Клименко,
М.І. Онищенко

Харківський державний
медичний університет

Influence of low-energy gamma-radiation on rat
blood serum chemiluminescence at chronic
inflammation

Цель работы: Изучить дозовую зависимость интенсивности хемилуминесценции при действии низкоинтенсивного гамма-излучения на фоне хронического воспаления.

Материалы и методы: Работа выполнена на 96 крысах-самцах линии Вистар. Хроническое воспаление вызывали введением 4 мл 2 %-ного раствора карагинена в предварительно подготовленный подкожный воздушный мешок. Облучение проводили к 3-м и 7-м суткам воспаления в дозах 0,1, 0,5, 1,0 Гр при мощности дозы 20 мГр/ч. Оценивали пиковую и остаточную интенсивность хемилуминесценции сыворотки крови после добавления к образцу 2 мл 10 %-ной перекиси водорода.

Результаты: Облучение к 3-м суткам воспаления приводит к усилению максимальной интенсивности хемилуминесценции сыворотки крови, причем эффект обнаруживается спустя 4 суток после облучения (7-е сутки воспаления), зависимость эффекта от дозы имеет линейный характер. Облучение к 7-м суткам приводит к изменению максимальной интенсивности хемилуминесценции лишь при дозе 0,1 Гр, причем сразу после облучения эта величина увеличивается, а спустя 7 суток (14-е сутки воспаления) уменьшается.

Выводы: Результаты свидетельствуют о возможности повреждения ДНК продуктами перекисного окисления липидов при указанных дозах облучения и сроках воспаления, а также усиления онкогенного потенциала хронического воспаления.

Ключевые слова: хроническое воспаление, низкоинтенсивное гамма-излучение, хемилуминесценция, перекисное окисление липидов.

Objective: To study dose dependence of chemiluminescence (CL) intensity at exposure to low-intensity gamma-radiation against a background of chronic inflammation.

Material and Methods: The study involved 96 Wistar male rats. Chronic inflammation was caused by injection of 4 ml 2 % caraginen solution to a preliminary prepared skin sac. Irradiation was delivered on day 3 and 7 of inflammation at a dose of 0.1, 0.5, 1.0 Gy (dose rate 20 mGy/h). Peak and residual intensity of blood serum chemiluminescence was assessed after addition of 2 ml of 10 % hydrogen peroxide to the sample.

Results: By day 3 of inflammation, the irradiation caused increase in maximum intensity of blood serum CL, the effect was observed 4 days after the irradiation (day 7 of inflammation). Linear dependence of the effect on the dose was noted. By day 7 the irradiation caused changes in maximum CL intensity only at a dose of 1.0 Gy, immediately after the irradiation this value increased and 7 days later (day 14 of inflammation) it decreased.

Conclusion: Our findings suggest the possibility of DNA damage by the products of lipid peroxidation at the mentioned doses and terms of inflammation as well as increase of oncogenic potential of chronic inflammation.

Key words: chronic inflammation, low-intensity gamma-radiation, chemiluminescence, lipid peroxidation.

На сьогодні в зв'язку з несприятливою екологічною обстановкою набуває великого значення питання про вплив іонізуючого випромінення на живі організми. Підставою для подібного твердження є результати численних експериментальних робіт з радіаційного карциногенезу [1], а також епідеміологічних досліджень вивчення наслідків катастрофи на ЧАЕС [2] і атомного бомбардування в Хіросімі та Нагасакі [3].

Водночас важливим чинником виникнення злоякісних новоутворів також є запалення. Особливо це стосується хронічних процесів, які характеризуються інтенсивною клітинною проліферацією і вважаються передпухлинним станом, що продемонстровано й в експериментах на тваринах [4–6]. Агентами, які ушко-

джують ДНК, можуть виступати вільні форми кисню й окис азоту, які є одними з основних медіаторів запалення [7].

У даній роботі ми спробували непрямо оцінити ймовірність ушкодження ДНК активними формами кисню при дії низькоінтенсивного гамма-випромінення на фоні хронічного запалення. Для цього був обраний метод хемілюмінесценції (ХЛ) сироватки крові.

Найважливішими перевагами ХЛ як методу дослідження біологічних об'єктів є безконтактність (інформація виноситься з глибини клітини, з її мембран оптичним шляхом), неінвазивність, отримання мінімально викривленої безпосередньо в процесі дослідження інформації про стан біологічного об'єкта. Це вигідно відрізняє ХЛ від більшості методів до-

слідження біологічних систем, до неодмінних умов яких найчастіше належать умиртвіння тварини, фіксація тканин, розкладання на складові частини отриманих матеріалів, забарвлення і т.ін. При цьому чутливість ХЛ на 2–5 порядків вища від такої при інших методах (наприклад, радіоімунологічному) [8, 9].

Інтенсивність ХЛ характеризує перебіг реакції вільнорадикального перекисного окиснення (головним чином ліпідів), неодмінного супутника біологічного обміну речовин. Світіння живих тканин в ділянці довжин хвиль 360–820 нм визначається вільнорадикальним окисненням саме ліпідів у присутності молекулярного кисню. Цей факт підтверджений численними експериментами з використанням фотоелектронних помножувачів [10]. Хемолюмінесценція є наслідком екзотермічної реакції рекомбінації радикалів з утворенням збуджених електронних станів. Серед хемічних ініціаторів перекисного окиснення ліпідів у живих системах центральне місце посідають активні форми кисню: синглетний кисень, супероксидний аніон-радикал, перекис водню. Вони утворюються в клітині в результаті багатьох ферментативних і неферментативних реакцій, з яких найбільш істотною є каталітичне одноелектронне відновлення молекулярного кисню. Вільні форми кисню, як відомо, активно синтезуються як при запаленні, так і в результаті радіолізу води при опромінуванні.

Методика дослідження

Роботу виконано на 96 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г. Як модель хронічного запалення було обрано карагієнове асептичне гранулематозне запалення. Під шкіру спини тварини вводили 8 мл стерильного повітря. Через 24 години в отриманий підшкірний мішок вводили 4 мл 2 %-ого розчину λ -карагієну в ізотонічному розчині NaCl. Розчин карагієну стерилізували автоклавуванням при 121 °C протягом 15 хв. Усі процедури виконували під ефірною анестезією [11].

Для опромінування використовували джерело гамма-випромінювання (ОВ-6, ^{137}Cs , 20 Ci, 14,3 мкГр/год. на відстані 1 м, Німеччина). Така інтенсивність опромінування відповідає радіаційним умовам, у яких перебували люди, що проживали в місцях ядерних катастроф. Тваринами були отримані дози 0,1, 0,5 і 1,0 Гр протягом 4,8; 24 і 48 год. відповідно. Доза 0,1 Гр лежить у ділянці так званих малих доз (менше 0,2 Гр або 1 трек на ядро), що вважалися донедавна відносно безпечними. Класичною радіобіологічною дозою є 1,0 Гр, ефекти якої добре вивчені при гострому опромінуванні. Доза в 0,5 Гр відповідає проміжній ділянці. Щури першої серії дослідів були опромінені до 3-ї доби запалення. Їх забивали

декапітацією під ефірним наркозом відразу після опромінування і на 7-му добу запалення. Тварин другої серії дослідів опромінювали до 7-ї доби і забивали по закінченні опромінування та на 14-ту добу запалення. Обрані терміни хронічного запального процесу відповідають пікам макрофагальної (3-тя доба) і фібробластичної (7-ма доба) проліферації [11]. Вважаючи, що радіаційна чутливість у ці періоди максимальна, опромінування проводили до цих же термінів. Крім негайного ефекту дії гамма-випромінювання, становив інтерес відстрочений ефект низькоінтенсивного опромінування. Контролем служили тварини, у яких викликали запалення, але опромінуванню не піддавали.

Для ХЛ 0,5 мл отриманої сироватки крові вносили до вимірювального термостатованого при 37 °C бюкса. Потім його вміщували перед фотокатодом фотоелектронного помножувача. Спочатку вимірювали фон установки при закритій шторці, потім — при відкритій — інтенсивність спонтанного світіння. Після першої хвилини вимірювання за допомогою спеціального каналу в бюкс додавали 2 мл 10 %-ого розчину перекису водню. Після такого додавання спостерігалася характерна кінетика світіння, яку реєстрували на самописному приладі й на комп'ютері. Вимірювали такі параметри кінетики: пікову інтенсивність ХЛ, кінцеве значення після 4 хв вимірювань. Пікова інтенсивність ХЛ сироватки крові відбиває загальну відповідь організму на дію іонізуючого випромінювання. Залишкова інтенсивність ХЛ визначає антиоксидантний резерв організму.

Тварини всіх експериментальних груп перебували в однакових умовах, водний і харчовий режим — *ad libitum*.

Для статистичної обробки використовували непарний тест Стьюдента. Статистично вірогідними вважали результати з $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

На рис. 1 а представлена залежність пікової інтенсивності ХЛ сироватки крові від дози в тварин, опромінених до 3-ї доби запалення. Крива 1 відповідає групі щурів, яких забивали негайно після опромінування, крива 2 — групі забитих на 7-му добу запалення. Як видно, крива дозової залежності пікової інтенсивності ХЛ сироватки крові тварин першої групи має складний характер. При дозі 0,1 Гр цей показник дещо нижчий за контроль, при 0,5 Гр він підвищується, набуваючи максимального значення, і при 1,0 Гр знову знижується. Однак ці коливання не є статистично вірогідними. Дозова залежність інтенсивності ХЛ у тварин другої групи має майже лінійний характер. Слід зазначити, що збільшення інтенсивності світіння сироватки при дозах 0,5 і 1,0 Гр статистично вірогідне щодо контролю.

В цілому можна відзначити, що радіаційна відповідь на 3-тю добу хронічного запалення не виявляється безпосередньо після опромінування в досліджуваному діапазоні доз. У той же час через 4 доби після опромінування в тварин спостерігається радіаційний дозо-

лежний ефект. Можна припустити, що за цей час відбувається накопичення хемічних продуктів радіаційного впливу, таких як продукти перекисного окиснення ліпідів, і структурних ушкоджень клітин, які вже за відсутності опромінювання визначають радіаційний ефект. Це підтверджують і отримані дані про антиоксидантний резерв організму (залишкова ХЛ, рис. 1 б). Видно, що залишкова інтенсивність ХЛ у тварин першої групи при дозах 0,5 і 1,0 Гр практично не відрізняється (крива 1), однак збільшується з дозою в особин другої групи (крива 2). Це вказує на відстрочену активацію захисних антиоксидантних механізмів у відповідь на накопичування продуктів радіаційного впливу. Цікавою особливістю є віро-

гідно значуща відмінність у контрольних групах, що відповідають 3-й і 7-й добі запалення. На 3-тю добу цей показник значно вищий. Він швидко знижується в першій групі при опромінюванні в дозі 0,1 Гр (див. рис. 1 б, крива 1). Очевидно, це пояснюється особливістю клітинного складу осередку запалення на 3-тю добу (переважанням макрофагів), що має значні ресурси антиоксидантного захисту, які, проте, швидко виснажуються.

Дозова залежність показників ХЛ у тварин, опромінюваних до піка фібробластичної проліферації (7-ма доба), представлена на рис. 2 а, б. Крива 1 відповідає групі тварин, яких забивали негайно після опромінювання, крива 2 — тим, яких забивали на 14-ту добу запален-

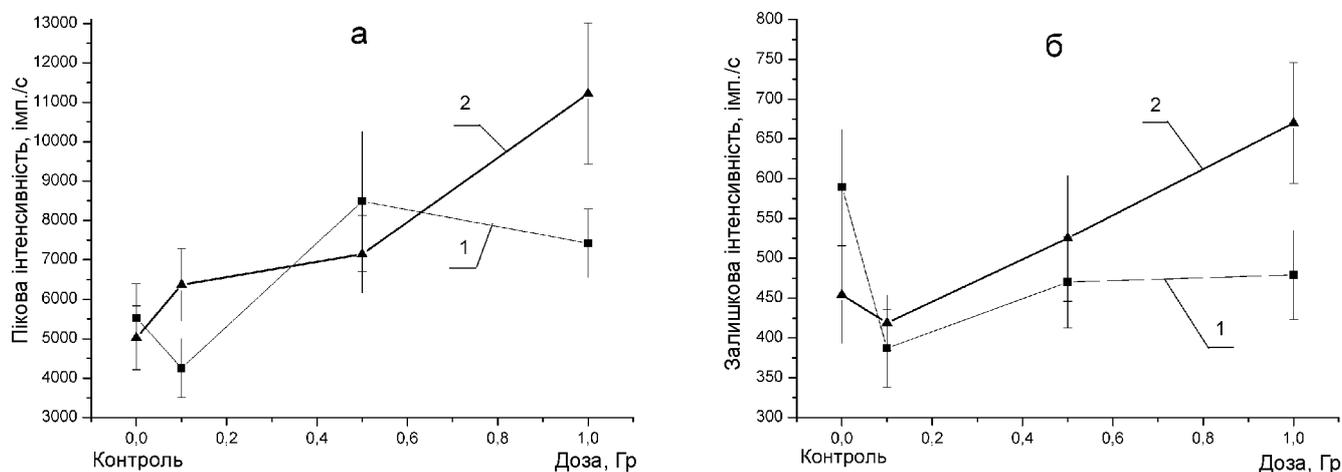


Рис. 1 — Залежність пікової (а) та залишкової (б) інтенсивностей ХЛ сироватки крові щурів, опромінюваних до 3-ї доби запалення, від дози опромінювання: 1 — відразу після опромінювання; 2 — на 7-му добу запалення (4-ту добу після опромінювання)

Fig. 1 — Dependence of peak (а) and residual (б) blood serum CL intensity in rats irradiated before day 3 of inflammation: 1 — immediately after irradiation; 2 — on day 7 of inflammation (day 4 after irradiation)

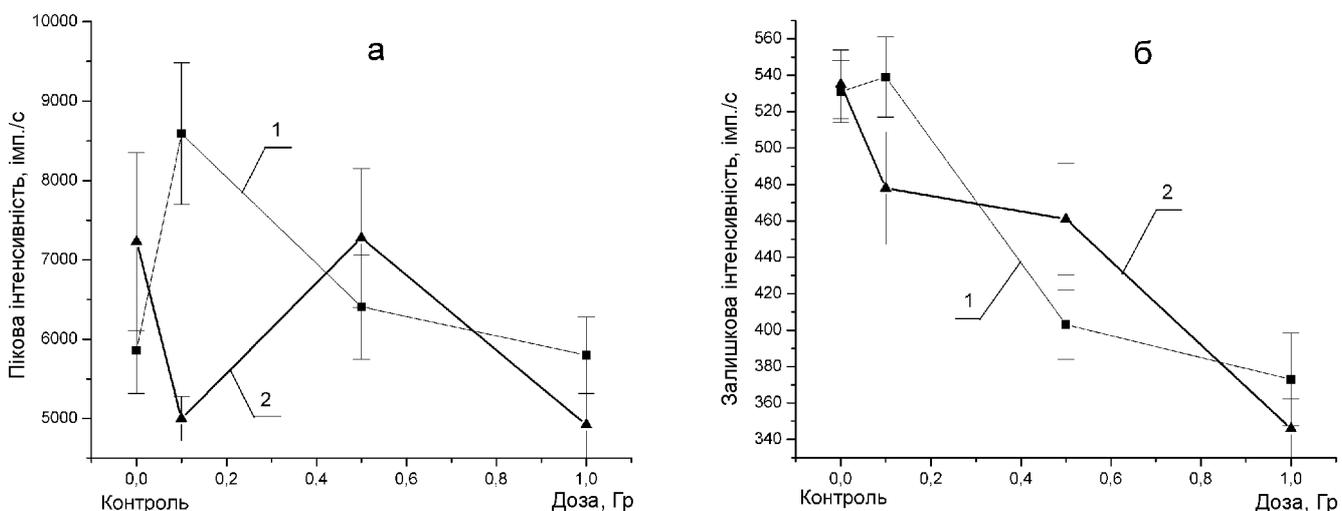


Рис. 2 — Залежність пікової (а) та залишкової (б) інтенсивностей ХЛ сироватки крові щурів, опромінюваних до 7-ї доби запалення, від дози опромінювання: 1 — відразу після опромінювання; 2 — на 14-ту добу запалення (7-му добу після опромінювання)

Fig. 2 — Dependence of peak (а) and residual (б) blood serum CL intensity in rats irradiated before day 7 of inflammation: 1 — immediately after irradiation; 2 — on day 14 of inflammation (day 7 after irradiation)

ня. Цікавою особливістю є те, що в щурів першої групи виявляється негайний радіаційний ефект іонізувального опромінення, причому тільки при дозі 0,1 Гр. При 0,5 і 1,0 Гр цей показник практично не відрізняється від контролю. Віддалений ефект, що визначався в тварин другої групи, дає протилежну картину. Пікова інтенсивність ХЛ вірогідно нижча за контроль при дозі 0,1 Гр. При цьому також відзначається підвищення пікової інтенсивності при дозі 0,5 Гр до рівня контролю і зниження при 1,0 Гр до рівня, що спостерігався при дозі 0,1 Гр. Причому всі відмінності щодо попередніх термінів статистично вірогідні.

Можна припустити, що механізми радіаційної відповіді при запаленні на 7-му добу відмінні від таких при запаленні на 3-тю. По-перше, при запаленні на 7-му добу радіаційна відповідь негайна і, очевидно, визначається або безпосередньою дією іонізувального випромінювання, або опосередкована деякими молекулами, що живуть мало. По-друге, виявляється вища чутливість до дії іонізувального випромінювання в дозі 0,1 Гр і відсутність негайної відповіді при більших дозах (0,5, 1,0 Гр) (див. рис. 2 а, крива 1). Останнє явище можна пояснити неспрацьовуванням антиоксидантної захисної системи при малих дозах. Це також підтверджується відсутністю виснаження антиоксидантного резерву при дозі 0,1 Гр у першій групі тварин (рис. 2 б, крива 1). Виявлений нами бімодальний характер кривої дозової залежності у другій групі тварин (див. рис. 2 а, крива 2) був раніше вперше описаний Бурлаковою і співавторами в опромінюваних первинно здорових тварин [12], однак у нашому випадку ефект при дозах 0,1 і 1,0 Гр був не більшим, а, навпаки, меншим, ніж у контролі й при дозі 0,5 Гр. Певно, така поведінка кривої зумовлена запаленням, яке передуює опромінюванню і самостійно активує перекисне окиснення ліпідів та видозмінює відповідь організму на опромінювання. Слід зазначити, що антиоксидантний резерв знижується з дозою в обох групах тварин (див. рис. 2 б), що можна пояснити виснаженням антиоксидантної системи зі збільшенням термінів запалення. Загалом реакція на опромінювання до 7-ї доби, очевидно, пояснюється переважанням фібробластів у клітинному складі вогнища запалення.

Таким чином, опромінювання до 3-ї доби запалення приводить до посилення максимальної інтенсивності ХЛ сироватки крові, причому ефект виявляється через 4 доби після опромінювання (7-ма доба запалення). Залежність ефекту від дози має лінійний характер. Опромінювання до 7-ї доби приводить до зміни максимальної інтенсивності ХЛ лише при дозі 0,1 Гр, причому відразу після опромінювання ця величина збільшується, а через 7 днів (14-та доба запалення) зменшується.

Висновки

Результати дослідів свідчать про можливість ушкодження ДНК продуктами перекисного окиснення ліпідів при обраних дозах опромінювання і термінах запалення, а також посилення онкогенного потенціалу хронічного запалення.

Література

1. Е.Б. Бурлакова, В.Н. Ерохин. // *Радиац. биол. Радиоэкол.* — 2001. — Т. 41, № 4. — С. 385–388.
2. *Chernobyl 10 years on* // *Brit. Med. J.* — 1996. — № 312. — P. 1052–1053.
3. Preston D., Hiroo K., *Studies of the Mortality of A-Bomb Survivors. Report 8. Cancer Mortality 1950–1982 (REF TR-1-86).* — *Radiation Research* 111.
4. Dyer R.D. // *Inflam. Res.* — 2002. — Vol. 51. — P. 71–72.
5. Murthy S., Winkler J.D. // *Ibid.* — P. 76–76.
6. Ames B.N., Swirsky Gold L., Willett W.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 5258–5265.
7. Dreher D., Junod A.F. // *Eur. J. Cancer.* — 1996. — Vol. 32A. — P. 30–38.
8. Snell F.D. *Photometric and Fluorometric Methods - Nonmetals* / Wiley J., ed. — New York: Marcel Dekker, 1981. — 690 p.
9. Weeks I.: *Chemiluminescence Immunoassay.* — Amsterdam, Elsevier, 1992.
10. Журавлев А.И. *Субстраты и механизмы эндогенной химической генерации возбужденных электронных состояний и сверхслабого свечения в тканях // Сверхслабое свечение в биологии.* — М.: Наука, 1972. — С. 17–32.
11. Ghosh A.K., Hirasawa N., Niki H., Ohuchi K. // *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* — 2000. — Vol. 295. — P. 802–809.
12. Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Горбунова Н.В. и др. // *Радиац. биол. Радиоэкол.* — 1996. — Т. 36, вып. 4. — С. 610–632.

Надходження до редакції 15.01.2004.

Прийнято 19.01.2004.

Адреса для листування:

Клименко Микола Олексійович,
Харківський медичний університет, пр-т Леніна, 4, Харків,
61022, Україна