

О.В. Кузьменко,  
Н.А. Никифорова,  
М.О. Іваненко

ДУ Інститут медичної  
радіології ім. С.П. Григор'єва  
АМН України, Харків

## Індивідуальні особливості відновлення показників імунітету щурів після загального одноразового рентгенівського опромінювання

Individual peculiarities of immunity indices  
restoration in rats after total single x-ray  
exposure

**Цель работы:** Сравнение послерадиационного восстановления показателей иммунитета у крыс с разной исходной реактивностью кроветворной системы при условии их облучения в разное время суток.

**Материалы и методы:** Эксперимент проведен на 80 белых беспородных крысах-самцах. За две недели до рентгеновского облучения животных подвергали 3-часовому иммобилизационному стрессу в положении лежа на животе. По соотношению числа лимфоцитов к нейтрофилам крысы были разделены на гипо- и гиперреактивных. Животных облучали тотально однократно в дозе 4 Гр в 8:00 и 20:00. Иммунологические показатели определяли на 3, 7, 14, 21 и 30-е сутки после облучения. Для изучения циркадных ритмов иммунологических показателей (ЦИК, Ig G) забор крови осуществляли с 6-часовым интервалом (в 6:00, 12:00, 18:00, 24:00 и 6:00 следующих суток).

**Результаты:** Показано, что индивидуальные различия в реакции животных на стресс определяют степень пострадиационных нарушений гуморального звена иммунитета, начиная с 3-х суток после рентгеновского облучения. Изменения иммунологических показателей крови крыс, облученных в 20:00, достоверно различались между гипо- и гиперреактивными животными во все сроки наблюдения. Было установлено, что независимо от того, в какое время суток проводили рентгеновское облучение, как у гипо-, так и у гиперреактивных животных не происходило полного восстановления изучаемых иммунологических показателей, вплоть до конца наблюдения (30-е сутки). Исключение составили гипореактивные животные, облученные в 20:00.

**Выводы:** У гипореактивных животных, облученных в 20:00, повреждающее действие радиации на изучаемые показатели иммунитета (Ig G, ЦИК) было минимальным по сравнению с гиперреактивными, а также со всеми крысами, облученными в 8:00, независимо от реакции на стресс.

**Ключевые слова:** иммобилизационный стресс, ионизирующая радиация, индивидуальная реакция, иммунитет.

**Мета роботи:** Порівняння післярадіаційного відновлення показників імунітету в щурів з різною вихідною реактивністю кроветворної системи за умови їх опромінювання в різний час доби.

**Матеріали і методи:** Експеримент проведено на 80 білих беспородних щурах-самцях. За 2 тижні до рентгенівського опромінювання тварин піддавали 3-годинному іммобілізаційному стресу в положенні лежачи на животі. За відношенням кількості лейкоцитів до нейтрофілів тварин поділили на гіпер- і гіпореактивних. Їх опромінювали тотально одноразово в дозі 4 Гр о 8:00 і 20:00. Імунологічні показники визначали на 3, 7, 14, 21 і 30-ту добу після опромінювання. Для вивчення циркадних ритмів імунологічних показників (ЦИК, Ig G) забирали кров з 6-годинним інтервалом (о 6:00; 12:00; 18:00; 24:00 та 6:00 наступної доби).

**Результати:** Показано, що індивідуальні відмінності в реакції тварин на стрес визначають ступінь пострадіаційних порушень гуморальної ланки імунітету, починаючи з 3-ї доби після радіаційного впливу. Зміни імунологічних показників крові щурів, опромінені о 20:00, вірогідно відрізнялися в гіпо- і гіперреактивних тварин у всі терміни спостереження. Було встановлено, що незалежно від того, в який час доби проводили рентгенівське опромінювання, як у гіпо-, так і в гіперреактивних тварин не відбувалося повного відновлення імунологічних показників аж до кінця спостережень (30-ї доби). Виняток становили гіпореактивні тварини, опромінені о 20:00.

**Висновки:** У гіпореактивних тварин, опромінені о 20:00, була мінімальна ушкоджувальна дія радіації на досліджувані показники імунітету (Ig G, ЦИК) порівняно з гіперреактивними, а також з усіма щурами, опромінені о 8:00, незалежно від реакції на стресс.

**Ключові слова:** іммобілізаційний стресс, іонізувальна радіація, індивідуальна реакція, імунітет.

Підхід, заснований на оцінці індивідуальних особливостей реакції організму на вплив як радіаційних, так і нерадіаційних чинників, у наш

час набув особливої актуальності. Важливість такого підходу викликана необхідністю прогнозування ускладнень, які виникають, зокрема з боку

імунітету, при застосуванні іонізуючого випромінювання в онкологічній практиці. Експериментальні дані свідчать, що радіочутливість є окремим проявом особливостей загальної реактивності індивідуума [1].

При стрес-реакції відбувається фазна зміна імунологічної реактивності. Початковий період характеризується перерозподілом імунокомпетентних клітин, зниженням імунної відповіді як клітинної, так і гуморальної ланки імунної системи. Подальші реакції залежать від інтенсивності та тривалості дії негативного фактора, а також від реактивності організму [2, 3]. Дані про вплив стресового фактора на імунологічні показники різних за реактивністю тварин досить нечисленні й не дозволяють одержати чітке уявлення про відповідну реакцію імунної системи на зміну стану організму [4, 5]. Вивчення механізмів розвитку реакцій імунної системи на зовнішній подразник (стресор) залежно від її вихідного стану може відкрити перспективи цілеспрямованого впливу на імунний статус, а також прогнозування кінцевого результату впливу стресового фактора залежно від вихідного стану лімфоендокринних взаємодій [6, 7].

Мета даної роботи полягала у порівнянні післярадіаційного відновлення показників імунітету у щурів із різною вихідною реактивністю кровотворної системи за умов їх опромінювання у різний час протягом доби.

## Методика дослідження

Експериментальні дослідження виконували на 80 білих безпородних щурах-самцях тримісячного віку масою 180–220 г, які перебували в умовах стандартного світлового та харчового режиму (вода та їжа *ad libitum*).

Дослідження на тваринах проводили у відповідності до Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах (Україна, 2001 р.), що узгоджується з положенням європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Для формування емоційно-стресового стану використовували модель іммобілізаційного стресу. Щури перебували в даних умовах протягом 3 годин. Дослідження проводили о 6:00, за два тижні до опромінювання.

Перед іммобілізацією та відразу після неї у тварин визначали вміст лімфоцитів і нейтрофілів у периферичній крові за допомогою гематологічного аналізатора Sysmex M 2000 (Японія) та обчислювали коефіцієнт їх співвідношення (л/н). За ступенем змін коефіцієнта співвідношення після іммобілізації відносно вихідного значення щурів розподілили на дві групи — гіпер- і гіпореактивних (по 40 особин у кожній групі).

Щурів опромінювали о 8:00 (група I — гіперреактивні, група III — гіпореактивні,  $n = 20$  для всіх груп) та о 20:00

(група II — гіперреактивні, група IV — гіпореактивні) у дозі 4 Гр, по м'яких тканинах, на рентгенапараті РУМ-17 при напрузі 190 кВ, силі струму 10 мА, фільтрах 0,5 мм Cu + 1 мм Al. Потужність дози 0,216 Гр/хв у м'яких тканинах. Кількості тварин у групі і спостережень збігаються.

Наслідки впливу x-променів на показники імунітету вивчали в динаміці на 3, 7, 14, 21, 30-ту добу після променевої дії. Кров відбирали з латеральної хвостової вени, під легким ефірним наркозом, протягом доби з інтервалом 6 годин (о 6:00, 12:00, 18:00, 24:00 та 6:00 наступної доби). Ці часові точки були обрані на підставі попередніх досліджень [8, 9] як такі, що найоб'єктивніше відображують добові коливання досліджуваних імунологічних показників.

Імунологічні дослідження включали спектрофотометричний мікрометод визначення сироваткового імуноглобуліну класу G та циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) [10, 11].

Отримані дані опрацьовували за допомогою пакета статистичних програм Biostat (ver. 4.03). Щоб встановити вірогідність різниці між групами, використовували t-критерій Стьюдента для незв'язаних явищ. Для оцінки біологічних ритмів використовували метод математичного аналізу «Косинор», який дозволяє характеризувати ритмічність процесу, зокрема за такими показниками, як амплітуда (половина різниці між мінімумом та максимумом відповідної функції косинуса) та акрофаза (час максимуму від 0 годин як відбиття функції) [12, 13].

## Результати та їх обговорення

Вихідне значення коефіцієнта співвідношення до іммобілізації в середньому по вибірці становило  $2,30 \pm 0,09$ . За змінами цього коефіцієнта після іммобілізації щурів розподілили на гіперреактивних ( $\lambda/n < 2,30 \pm 0,09$ ) і гіпореактивних (після іммобілізації  $\lambda/n > 2,30 \pm 0,09$ ). Середнє значення даного коефіцієнта у гіпер- і гіпореактивних тварин, відповідно, дорівнювало  $0,47 \pm 0,01$  і  $1,02 \pm 0,08$  л/н (відмінності між групами вірогідні,  $n = 80$ ;  $p < 0,01$ ).

Імунні комплекси утворюються при зустрічі антигену з антитілом і звичайно ефективно руйнуються мононуклеарними фагоцитами [14–16]. Формування ЦІК — обов'язковий етап будь-якої імунної реакції, що забезпечує знешкодження і ступінь елімінації патогенного матеріалу (токсини, мікроорганізми, продукти тканинного розпаду та ін.). Аналіз змін концентрації ЦІК у сироватці крові стресованих щурів виявив підвищення даного показника у гіпореактивних особин (рис.1). Згідно з даними С.І.Степанової, це може бути пов'язаним з активацією парасимпатичної нервової системи [17].

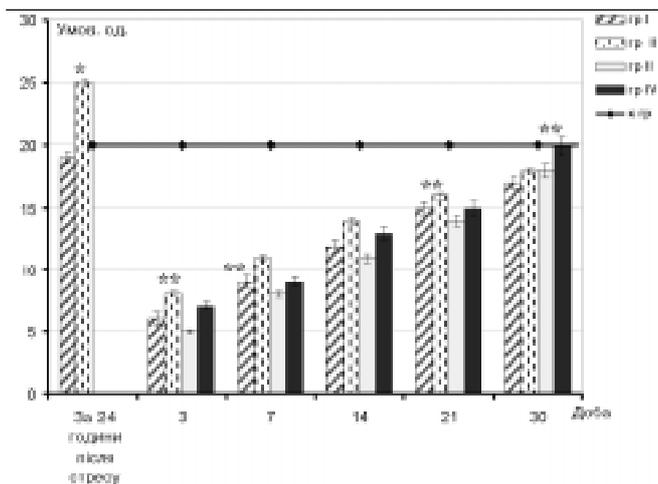


Рис. 1. Зміна концентрації ЦІК у сироватці крові гіпо- та гіперреактивних щурів. Розходження вірогідні: \* —  $p < 0,05$  щодо показників до опроміювання, \*\* — між групами (I та III; II та IV); «к гр» — вихідне значення показника, спільне для всіх тварин до іммобілізації

Fig. 1. Changes in blood serum CIC concentration in hypo- and hyperreactive rats. Differences are significant: \* —  $p < 0.05$  as to the indices before the exposure, \*\* — between the groups (I and III; II and IV); «к гр» — initial parameter similar in all animals before the immobilization

На 3-тю добу після радіаційного впливу спостерігали зниження концентрації ЦІК у сироватці крові як у гіпо-, так і у гіперреактивних тварин (рис. 2). На 30-ту добу не було зареєстровано повного відновлення рівня ЦІК у всіх тварин, за винятком групи IV, відносно загального контролю до іммобілізації.

Ig G — головний ізотип Ig нормальної сироватки щурів; на його частку припадає 70–75 % загальної кількості сироваткових Ig. Імуноглобуліни класу G рівномірно розподілені між внутрішньо- та позасудинним пулом і становлять більшість антитіл вторинної імунної відповіді, а також основну частину антитоксинів. Клітинні рецептори для Ig G опосередковують низку ефекторних функцій антитіл. Перехресна зшивка антигеном антитіл Ig, пов'язаних з рецепторами, ініціює ту або іншу активність клітини [18–20].

Вивчення концентрації Ig G виявило підвищення його вмісту в сироватці гіперреактивних щурів (див. рис. 2), при цьому значення даного параметра починало зростати через 24 години після впливу стресового фактора. Підвищення концентрації Ig G у периферичній крові може свідчити про поліклональну активацію В-клітин, що у свою чергу може призвести до зниження гуморальної імунної відповіді.

На 3-тю добу після радіаційного впливу спостерігали зниження концентрації Ig G у пери-

феричній крові як у гіпо-, так і у гіперреактивних тварин (див. рис. 2). Це можна пояснити зменшенням кількості лімфоцитів, головним чином, за рахунок зниження Т-клітин, кількість В-клітин при цьому зростає.

На 14-ту добу спостерігали підвищення Ig G у сироватці крові гіперреактивних тварин (групи I та II). На 30-ту добу не зареєстровано повного відновлення вихідного рівня Ig G в усіх тварин, за винятком групи IV, відносно загального контролю до іммобілізації (див. рис. 2).

Це може бути наслідком не тільки реактивності тварин, а й ритмічних змін імунної відповіді протягом доби. Добові біологічні ритми — міцний модифікатор дії терапевтичних засобів, зокрема опроміювання. Це свідчить, що доза опромінення, яка потребує адекватної реакції з боку імунної системи, може змінюватись протягом доби.

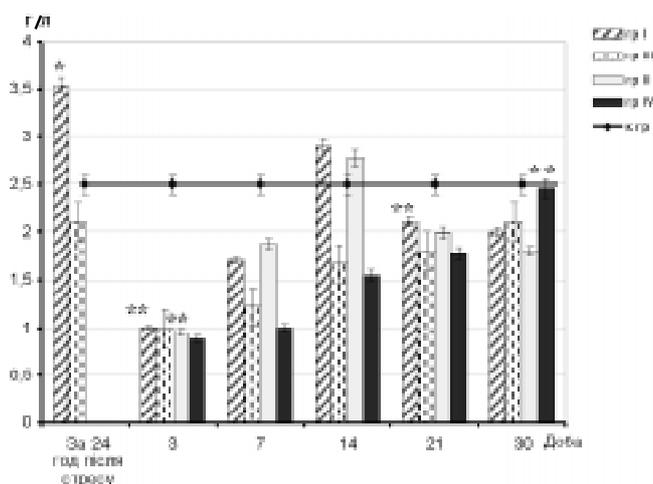


Рис. 2. Концентрація Ig G у сироватці крові гіпо- та гіперреактивних щурів. Розходження вірогідні: \* —  $p < 0,05$ , щодо показників до опроміювання, \*\* — між групами (I та III; II та IV); «к гр» — вихідне значення показника, спільне для всіх тварин до іммобілізації

Fig. 2. Blood serum Ig G concentration in hypo- and hyperreactive rats. Differences are significant: \* —  $p < 0.05$  as to the indices before the exposure, \*\* — between the groups (I and III; II and IV); «к гр» — initial parameter similar in all animals before the immobilization

Імунні функції модулюються у дослідних тварин (щурів) амплітудними циркадними ритмами. Зокрема, ЦІК та Ig G виявляють високівідтворювані коливання за 24-годинною шкалою.

Аналіз концентрації Ig G у сироватці крові гіпер- та гіпореактивних щурів, до опроміювання, у різний час доби виявив таку картину: максимальний рівень спостерігали в ранішньоранкові години — о 3:20 та о 4:00 для гіпер-

та гіпореактивних тварин відповідно (рис. 3). Мінімум припадав на денний час — 13:40 — для гіперреактивних тварин, та на 12:50 — для гіпореактивних. Розходження між часовими дослідними точками 6:00 та 12:00 було вірогідне ( $p < 0,05$ ). Оскільки розходження між такими точками 18:00 та 6:00 також було вірогідним ( $p < 0,05$ ), то можна говорити, що період підвищеної концентрації Ig G припадає на часовий проміжок з 24:00 до 6:00, а найменшої — на період з 18:00 до 12:00, як для гіпо-, так і для гіперреактивних тварин. Аналіз індивідуальних значень концентрації Ig G у експериментальних тварин показав, що рівень вмісту Ig G не виходив за межі норми (2,5–3,5 г/л). Циркадні ритми досліджуваних імунологічних показників інтактних та стресованих щурів вірогідно не розрізнялися у всі терміни дослідження. Після радіаційного впливу спостерігали (див. рис. 3): зсув акрофази з  $3:20 \pm 0:10$  на  $13:05 \pm 0:11$  — для групи I,  $14:20 \pm 0:15$  — для групи II. Для гіпореактивних тварин акрофаза зміщувалась з  $4:00 \pm 0:12$  на  $13:50 \pm 0:12$  — для групи III та на  $14:00 \pm 0:10$  — для групи IV. Відновлення добового ритму Ig G спостерігали на 14-ту добу для гіперреактивних тварин, опромінені о 20:00 (група II), акрофаза зміщувалась на  $5:00 \pm 0:28$ . Однак на 30-ту добу в цій групі спостерігали зсув акрофази на  $6:00 \pm 0:12$ . Відновлення добового ритму концентрації Ig G відбувалося на 30-ту добу тільки для групи IV, в інших групах (I, II, III) повного відновлення даного показника не спостерігалось.

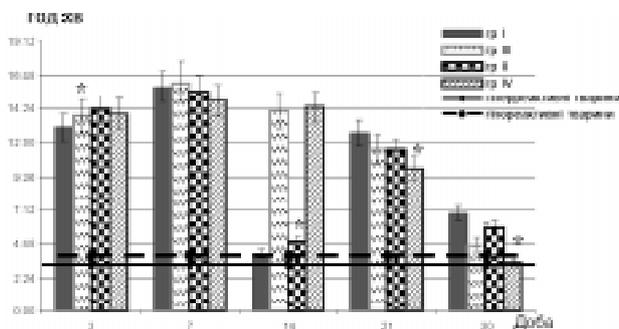


Рис. 3. Зміни акрофаз добових ритмів концентрації Ig G у сироватці крові гіпо- та гіперреактивних щурів, опромінені у різний час доби; \* розходження вірогідні між групами (I та III; II та IV),  $p < 0,05$

Fig. 3. Changes in circadian rhythms acrophases of blood serum IgG concentration in hypo- and hyperreactive rats irradiated at different time of the day; \* difference is significant between the groups (I and III; II and IV),  $p < 0.05$

Подібну картину спостерігали для післярадіаційних змін добових ритмів вмісту ЦІК у периферичній крові гіпо- та гіперреактивних тварин, опромінені у різний час доби (рис. 4).

Після радіаційного впливу спостерігали: зсув акрофази з  $4:40 \pm 0:15$  на  $15:05 \pm 0:11$  — для групи I (гіперреактивні тварини, опромінені о 8:00), на  $14:20 \pm 0:25$  — для групи II (гіперреактивні тварини, опромінені о 20:00). Для гіпореактивних тварин акрофаза зміщувалась з  $5:00 \pm 0:20$  на  $14:50 \pm 0:20$  — для групи III (гіпореактивні тварини, опромінені о 8:00) та на  $15:00 \pm 0:10$  — для групи IV (гіпореактивні тварини, опромінені о 20:00). Відновлення добового ритму ЦІК спостерігали на 14-ту добу для гіперреактивних тварин, опромінені о 20:00 (група II), акрофаза зміщувалась на  $5:00 \pm 0:28$ . Однак на 30-ту добу в цій групі спостерігали зсув акрофази на  $7:35 \pm 0:12$ . Відновлення добового ритму ЦІК спостерігали на 30-ту добу тільки для групи IV, в інших групах (I, II, III) відновлення було відсутнім

Таким чином, варто зазначити, що зміни добового ритму досліджуваних імунологічних показників (Ig G, ЦІК) після радіаційного впливу як у гіпо-, так і у гіперреактивних тварин були односпрямованими. Це може бути наслідком не тільки реактивності тварин, але й ритмічних змін клітинної проліферації в кровотворній тканині. Відомо, що добові коливання клітин кісткового мозку експериментальних тварин (щурів) прив'язані до ритму їх фізіологічної активності, і відбивають циклічність процесів проліферації та розподілу клітин крові. У наш

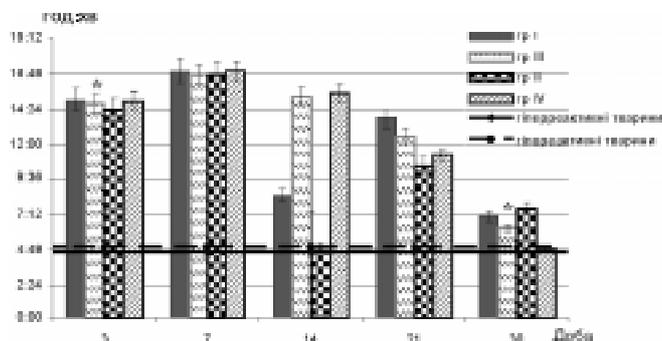


Рис. 4. Зміни акрофаз добових ритмів концентрації ЦІК у сироватці крові гіпо- та гіперреактивних щурів, опромінені у різний час доби; \* розходження вірогідні між групами (I та III; II та IV),  $p < 0,05$

Fig. 4. Changes in circadian rhythms acrophases of blood serum CIC concentration in hypo- and hyperreactive rats irradiated at different time of the day; \* difference is significant between the groups (I and III; II and IV),  $p < 0.05$

час доведено ритмічні зміни клітинної проліферації у кровотворних тканинах — клітини кісткового мозку зазнають циркадних коливань, експресуючи різні фази клітинного циклу [21, 22]. Опосередкованим показником проліферативної активності кісткового мозку є добові коливання кількості ядромісних клітин периферичної крові — лейкоцитів, нейтрофілів та лімфоцитів. Опромінювання щурів у вечірній час (о 20:00) справляє меншу ушкоджуючу дію на кістковий мозок, у зв'язку зі зниженням його проліферативної активності.

Різниця полягала в часі відновлення добових ритмів, що суттєво для організму, який перебуває у екстремальній ситуації. Інтенсивна первинна реакція на пошкоджувальну дію радіації у гіперреактивних тварин може стати згубною для організму, тому що відновлення відбувається в короткий проміжок часу, а потім настає тривала депресія імунної системи. Відзначені розходження в часі прояву реакцій імунної системи на радіаційний вплив можуть бути одним з факторів, що визначають радіочутливість імунної системи.

Проведені експериментальні дослідження дають можливість вважати, що гіперреактивні тварини мають більш високу радіочутливість кровотворної тканини, ніж гіпорективні.

Знання закономірностей зміни чутливості нормальних тканин до впливу пошкоджуючого фактора (радіації) протягом доби дозволяє знайти підходи до зменшення токсичності радіотерапії.

У перспективі отримані дані можуть становити теоретичну базу для розробки біоритмологічних підходів до лікування пацієнтів, які зазнали променевого ураження внаслідок радіаційних аварій, та при проведенні радіотерапії онкологічним хворим.

## ВИСНОВКИ

1. Інтенсивність пострадіаційної депресії досліджуваних показників імунітету (Ig G, ЦІК) визначається індивідуальними особливостями організму, зокрема вихідною реактивністю імунної системи у відповідь на неспецифічний стресорний вплив.

2. У гіпорективних щурів, опромінених у вечірній час, відбувається більш швидке відновлення показників імунітету, порівняно з гіперреактивними, а також з усіма тваринами, опроміненими о 8:00, незалежно від реакції на стрес. Це може пояснюватися тим, що опромінювання щурів о 20:00 справляє меншу ушкоджувальну дію на кістковий мозок у зв'язку зі зниженням його проліферативної активності.

## Література

1. Даренская Н.Г., Короткевич А.О., Малютина Т.С., Насонова Т.А. // *Рад.биол. Радиоэкол.* — 2001. — Т. 41, № 2. — С. 165–170.
2. Черешнев В.А., Юшков Б.Г. // *Мед.иммунол.* — 2002. — Т. 4, № 2. — С. 135–136.
3. Судаков К.В. *Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу.* — М.: Горизонт, 1998. — 317 с.
4. Шаляпина В.Г., Войлокова Н.И., Суворов Н.Ф., Ракицкая В.В. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* — 2001. — Т. 87, № 7. — С. 926–932.
5. Шапиро Ф.Б., Умарова Б.А., Струкова С.М. // *Там же.* — 1998. — Т. 84, № 5–6. — С. 469–473.
6. Казаков А.А., Анциферова М.А. // *Мед. иммунол.* — 2002. — Т. 4, № 2. — С. 122–123.
7. Рагинене И.Г., Камзавлакова Н.И., Булигин Г.В. // *Там же.* — С. 131–132.
8. Лозинская И.Н., Никифорова Н.А., Москаленко И.П. // *Радиобиол.* — 1992. — Т. 32, вып. 4 — С. 534–539.
9. Лозинская И.Н., Никифорова Н.А., Москаленко И.П. // *Там же.* — Т. 32, вып. 2. — С. 218–221.
10. *Медицинские лабораторные технологии / под ред. А.И. Карпищенко.* — СПб: Интермедика, 1999. — Т. 2. — 656 с.
11. *Энциклопедия клинических лабораторных тестов / под ред. Н.У. Тица: перевод под ред. В.В. Меньшикова.* — М.: Лабинформ, 1997. — С. 495–496.
12. Стентон Гланц *Медико-биологическая статистика / Стентон Гланц.* — М.: Практика, 1999. — 459 с.
13. Nelson W., Liang Tong Y., Lee J.-K., Halberg F. // *Chronobiol.* — 1999. — № 6. — Р. 305–323.
14. Поспишил М., Ваха И. *Индивидуальная радиочувствительность, ее механизмы и проявления* — М.: Энергоатомиздат, 1986. — 112 с.
15. Арушанян Э.Б., Чудновский В.С. // *Журн. невропатол. и психиатрии.* — 1988. — Т. 88, № 4. — С. 126–131.
16. Козловская М.М., Козловский И.И., Вальдман Е.А., Середенин С.Б. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* — 2002. — Т. 88, № 6. — С. 751–761.
17. Степанова С.И. *Биоритмологические аспекты проблемы адаптации* — М.: Наука, 1986. — 206 с.
18. Анохин К.В., Судаков К.В. // *Успехи физиол. наук.* — 1993. — Т. 24, № 3. — С. 53–70.
19. Дерев'яно Л.П., Носов А.Т. // *Лікар. спр.* — 2004. — № 5–6. — С. 64–68.
20. Хворостова Ю.В., Горякин С.В., Петрова Г.В., Филиппенко М.Л. и др. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* — 2002. — Т. 88, № 11. — С. 1423–1431.
21. Якобсон Г.С., Антонов А.Р., Петрова Г.В., Маслова Л.Н. и др. // *Общая патол. и пат. физиол.* — 1996. — № 5. — С. 495–498.
22. Хаитов Р.М., Лесков В.П. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова* — 2001. — Т. 87, № 8. — С. 1060–1073.

Надходження до редакції 17.04.2009.

Прийнято 19.06.2009.

Адреса для листування:  
Кузьменко Олена Вікторівна,  
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва АМНУ,  
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна