

М.О. Клименко, М.І. Онищенко

Вплив низькоінтенсивного γ -випромінювання на клітинний склад вогнища хронічного запалення

На моделі хронічного асептичного карагиненового запалення у крыс показано, що, низькоінтенсивне γ -ізлучення в малій дозі (0,1 Гр) викликає посилення проліферації фібробластів і макрофагів в очагах запалення і значительне зниження інтенсивності еміграції лімфоцитів при всіх досліджуваних дозах облучення. Отримані результати о стимуляції проліферації в очагах запалення з можливим накопленням помилок в структурі ДНК при ослабленому імунологічному надзорі со сторони лімфоцитів можуть косвенно указувати на вероятність посилення онкогенного потенціала очага хронічного запалення при действии низькоінтенсивного γ -ізлучення.

ВСТУП

Нині актуальні дослідження впливу низькоінтенсивного γ -випромінювання в невеликих дозах. Такі дози опромінення відповідають радіаційним умовам у місцях колишніх ядерних катастроф, і саме це випромінювання вважається фактором виникнення злоякісних новоутворень, про що свідчать результати численних експериментальних робіт з радіаційного карциногенезу [1], а також епідеміологічних досліджень з вивчення наслідків аварії на ЧАЕС [5] і атомного бомбардування в Хіросімі та Нагасакі [10].

У патології першочерговий інтерес викликає питання про вплив іонізуючого випромінювання на запалення – як основний патологічний процес, пов'язаний із системами організму, які в першу чергу уражаються радіацією, – імунною, системою крові, сполучною тканиною, мікроциркуляторним руслом. Саме аутоінфекційний синдром у вигляді численних вогнищ запалення, переважно на вхідних воротах для інфекції (глосит, гінгівіт, некротична ангіна, пневмонія) є головним

у клінічній картині гострої променевої хвороби.

Нині вивчено вплив γ -випромінювання у великих дозах на перебіг гострого запалення. Показано, що при цьому посилюються альтерація й ексудація та послабляються лейкоцитарна інфільтрація і, особливо, проліферація [2]. Однак дія низькоінтенсивного γ -випромінювання, особливо в малих дозах (менше ніж 0,2 Гр), практично не вивчено.

Водночас запалення також є станом, який сприяє виникненню злоякісних новоутворень. Особливо це стосується хронічного запалення, яке характеризується інтенсивною клітинною проліферацією та вважається передпухлинним станом, що також показано в експериментах на тваринах [4, 7, 9]. Агентами, що ушкоджують ДНК, можуть виступати вільнорадикальні форми кисню й окис азоту, які є одними з основних медіаторів запалення [6].

Мета нашого дослідження – вивчити вплив низькоінтенсивного γ -випромінювання в невеликих дозах на клітинну динаміку вогнища хронічного запалення, яка є основним його показником.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 96 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г. Тваринам було змодельовано хронічне карагіненове асептичне гранулематозне запалення. Під шкіру спину тварини вводили 8 мл стерильного повітря. Через 24 год в отриманий підшкірний мішок вводили 4 мл 2%-го розчину λ -карагінену в ізотонічному розчині NaCl. Розчин карагінену стерилізували автоклавуванням при 121 °C протягом 15 хв. Усі процедури виконували під ефірною анестезією [8].

Для опромінення використовували джерело γ -випромінювання (ОВ-6, 137Cs, 20 Ci, 14,3 мкГр/год на відстані 1 м, Німеччина). Тварини отримували дози 0,1, 0,5 і 1,0 Гр упродовж 4, 8, 24 і 48 год відповідно. Доза 0,1 Гр вважається малою і донедавна вважалася відносно безпечною. Доза 1,0 Гр є класичною радіобіологічною дозою, ефекти якої добре вивчено при гострому опроміненні. Доза 0,5 Гр знаходиться в проміжній зоні. Щурів I групи опромінювали до 3-ї доби запалення. Введення їх з експерименту здійснювали декапітацією під ефірним наркозом відразу після опромінення і на 7-му добу запалення. Тварин II групи опромінювали до 7-ї доби. Виведення з експерименту проводили по закінченні опромінення і на 14-ту добу запалення. Обрані терміни хронічного запального процесу відповідають пікам макрофагальної (3-тя доба) і фібробластичної (7-ма доба) проліферації [8]. Вважаючи, що радіаційна чутливість максимальна в ці періоди, опромінення проводили до цих самих термінів. Крім негайного ефекту γ -випромінювання, вивчали відстрочену дію низькоінтенсивного опромінення. Контролем були тварини, у яких викликали запалення, але опроміненню їх не піддавали.

Для гістологічного дослідження брали шматочки м'яких тканин з вогнища запалення, фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну, піддавали стандартній

проводці через спирти, концентрації яких збільшували, рідину Нікіфорова (96%-й спирт і діетиловий ефір у співвідношенні 1:1), хлороформ і заливали парафіном. З виготованих таким способом блоків робили серійні зрізи товщиною $4-5 \cdot 10^{-6}$ м, які фарбували гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за ван Гізеном. У 10 полях зору (збільшення в 400 разів) підраховували абсолютне число макрофагів, лімфоцитів, незрілих і зрілих фібробластів та обчислювали кількість клітин на одне поле зору.

Для статистичної обробки використовували критерій t Стьюдента. Статистично вірогідними вважали результати при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При вивченні клітинного складу вогнища хронічного запалення у тварин, опромінення яких здійснювали до 3-ї доби запалення і виводили з експерименту безпосередньо після опромінення, виявлено, що вміст макрофагів не змінюється при всіх дозах опромінення, у той час як вміст лімфоцитів вірогідно зменшується при дозах 0,5 і 1,0 Гр (рис. 1, I, а, б). Як відомо, лімфоцити не проліферують у вогнищі запалення (якщо запалення спостерігається не в лімфоїдній тканині). Зміна їхнього числа може відбутися внаслідок зміни інтенсивності еміграції лімфоцитів. Отримані результати свідчать про послаблення еміграції лімфоцитів у вогнище запалення зі збільшенням дози опромінення. Встановлено, що кількість незрілих фібробластів у вогнищі запалення вірогідно знижується лише при дозі 1,0 Гр (див. рис. 1, в), а зрілих – не змінюється зі збільшенням дози опромінення (див. рис. 1, г). Кількість фібробластів може змінюватися тільки через порушення проліферації у вогнищі запалення. Як відомо, цикл поділу фібробласта близько 40 год [3]. Отже, навіть у разі впливу опромінення на проліферативну активність, зміни кількості фібробластів не встигнуть відбутися, якщо виведення з експерименту здійснюється

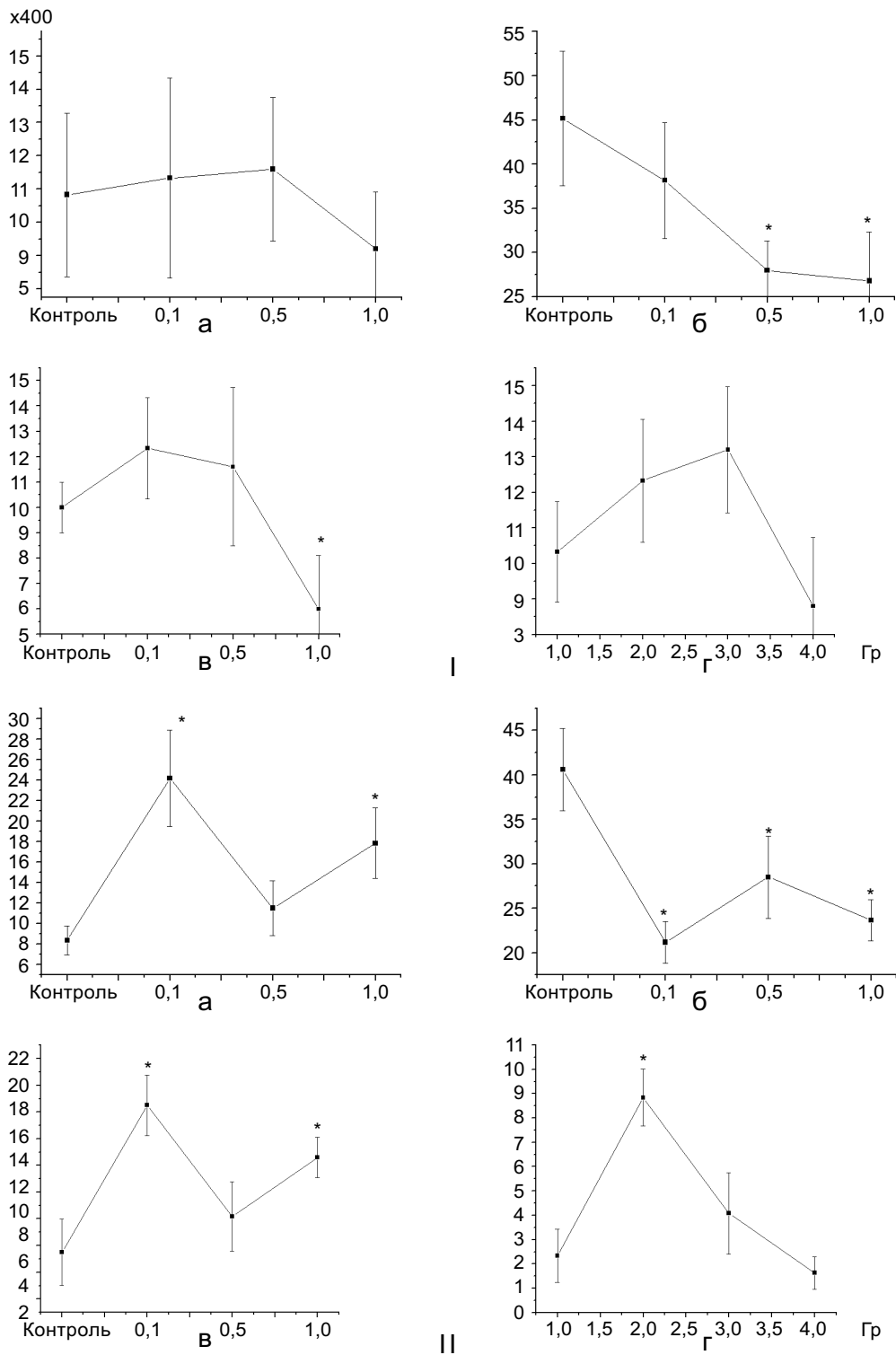


Рис. 1. Залежність кількості макрофагів (а), лімфоцитів (б), незрілих (в) і зрілих (г) фіброцитів у вогнищі запалення від поглиненої дози радіації у шурів, опромінених до 3-ї доби запалення, декапітацію яких здійснено відразу після опромінення (I) та на 7-му добу запалення (II). За віссю ординат – кількість клітин в одному полі зору, x400. За віссю абсцис – доза опромінення. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

безпосередньо після опромінення. Більше того, 3-тя доба не є піком проліферативної активності фібробластів. Виявлений ефект при опроміненні дозою 1,0 Гр, можна пояснити тим, що для досягнення цієї дози проводили опромінення 48 год через малу його потужність (2 сГр/год), а цей час порівнянний з періодом клітинного поділу фібробластів.

У разі вивчення клітинного складу вогнища запалення у тварин, опромінення яких проводили до 3-ї доби запалення, однак виведення з експерименту здійснювали на 7-му добу запалення, виявлено, що кількість макрофагів збільшується при дозах 0,1 і 1,0 Гр, а при дозі 0,5 Гр залишається практично незмінною (див. рис. 1, II,а). Як відомо, зміна кількості макрофагів у вогнищі запалення може відбуватися внаслідок зміни як їхньої проліферації, так і еміграції. Остання є більш динамічним процесом відносно зміни кількості клітин у вогнищі запалення порівняно з проліферацією. Той факт, що безпосередньо після опромінення не спостерігалися зміни кількості макрофагів залежно від дози (див. рис. 1, I,а), свідчить, що на 7-му добу ця зміна відбувається завдяки стимуляції їхньої проліферативної активності. На 3-тю та на 7-му добу запалення кількість лімфоцитів знижується (див. рис. 1, II,б), однак в останньому випадку зменшення відбувається при всіх дозах, в т.ч. і при дозі 0,1 Гр, причому, такою ж мірою, як і при великих дозах. Очевидно, дія дози 0,1 Гр на еміграцію лімфоцитів розвивається повільно й опосередковується через зміну стану інших клітин вогнища запалення, які безпосередньо реагують на опромінення (наприклад фібробласти та макрофаги) і можуть визначати процес еміграції лімфоцитів. При дозі 0,1 Гр кількість незрілих фібробластів збільшується порівняно з контролем (див. рис. 1, II,в). При дозі 0,5 Гр вірогідної різниці відносно контролю не відзначається. Водночас при дозі 1,0 Гр також виявляється достовірне

збільшення вмісту незрілих фібробластів, однак їх менше, ніж при дозі 0,1 Гр. Таким чином, дози 0,1 і 1,0 Гр отримані впродовж 3 діб, на 7-му добу запалення, стимулюють фібробластичну проліферацію. Вміст зрілих фібробластів (див. рис. 1, II,г) лише частково підтверджує те ж саме, що спостерігається для незрілих фібробластів. Збільшення кількості зрілих фібробластів виявляється лише при дозі 0,1 Гр, яка, очевидно, стимулює не тільки проліферацію, але і дозрівання фібробластів.

Виявлено (рис. 2, I,а), що у тварин, опромінення яких здійснювали до 7-ї доби запалення, а виводили їх з експерименту безпосередньо після опромінення, кількість макрофагів залежно від дози опромінення істотно відрізняється від такої у попередніх експериментах. Вона вірогідно знижується при дозах 0,5 і 1,0 Гр. Як і в попередніх спостереженнях, у даному разі еміграція лімфоцитів зменшується (див. 2, I,б), однак на відміну від 3-ї доби запалення, ефект виявляється лише при дозі 1,0 Гр. Таким чином, на 7-му добу запалення безпосередньо після опромінення відбувається послаблення еміграції і макрофагів, і лімфоцитів. Кількість як незрілих, так і зрілих фібробластів не змінюється (див. рис. 2, I,в,г).

При вивченні ефекту γ -випромінювання у тварин, коли опромінення проводили до 7-ї доби запалення, а виводили з експерименту через 7 діб після опромінення, тобто на 14-ту добу запалення, показано, що число макрофагів у вогнищі не залежить від дози опромінення (див. рис. 2, II,а). Викликає інтерес залежність кількості лімфоцитів у вогнищі запалення від дози опромінення. На 14-ту добу запалення посилюється еміграція лімфоцитів зі збільшенням дози опромінення (див. рис. 2, II,б). У попередніх трьох випадках еміграція лімфоцитів знижувалася під дією γ -випромінювання. Найбільш ефективною, як і раніше, є доза 0,1 Гр. Кількість фібробластів збільшується тільки при цій дозі внаслідок стимуляції проліферації і, очевидно,

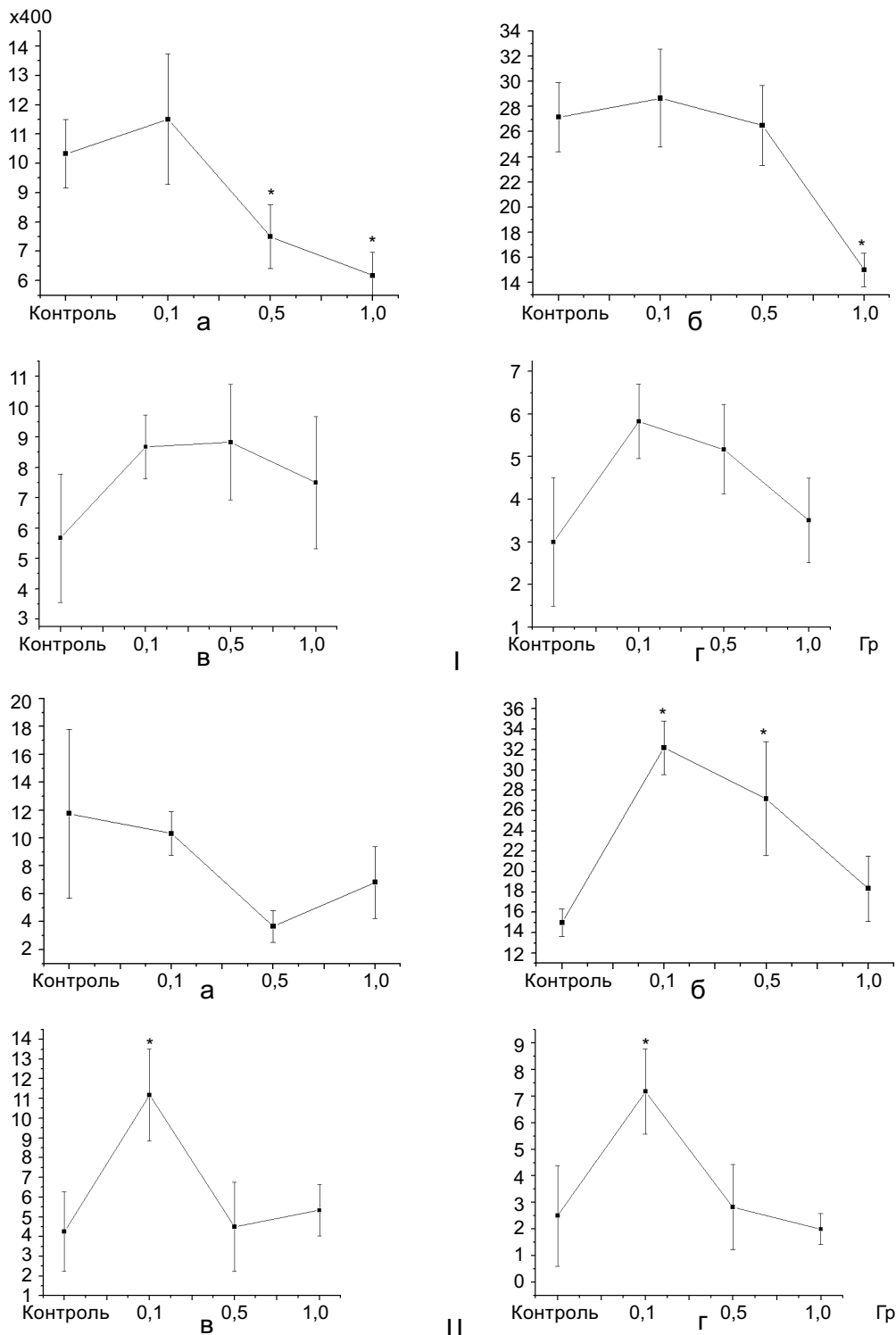


Рис. 2. Залежність кількості макрофагів (а), лімфоцитів (б), незрілих (в) і зрілих (г) фіброblastів у вогнищі запалення від поглиненої дози радіації у шурів, опромінених до 7-ї доби запалення, декапітацію яких здійснено відразу після опромінення (I) та на 14-ту добу запалення (II). За віссю ординат – кількість клітин в одному полі зору, x400. За віссю абсцис – доза опромінення. * P<0,05 порівняно з контролем

дозрівання фібробластів (див. рис. 2, П,в,г).

Отже, низькоінтенсивне γ -випромінювання впливає насамперед на проліферацію та дозрівання макрофагів і фібробластів у вогнищі запалення. Це виражається збільшенням їхньої кількості через деякий період після опромінення (на 7-му добу при опроміненні до 3-ї доби запалення для фібробластів; на 14-ту добу при опроміненні до 7-ї доби запалення для фібробластів і макрофагів). Причому ефективною виявляється доза 0,1 Гр. γ -випромінювання також впливає на еміграцію лімфоцитів у вогнище запалення, істотно знижуючи її на 3-тю і 7-му добу при опроміненні до 3-ї доби запалення, і на 7-му добу при опроміненні до 7-ї доби запалення, і підвищуючи її на 14-му добу при опроміненні до 7-ї доби запалення. Еміграція макрофагів також знижувалася на 7-му добу при опроміненні до 7-ї доби запалення.

Таким чином, у проведеному дослідженні виявлено два ефекти. По-перше, показано, що низькоінтенсивне γ -випромінювання малою дозою (0,1 Гр) викликає посилення проліферації фібробластів і макрофагів у вогнищі запалення, у той час як іонізуюче випромінювання вважається класичним фактором, що пригнічує проліферацію. Інгібуючу дію γ -випромінювання на проліферативну активність звичайно пов'язують зі здатністю фотонів великої енергії ушкоджувати ДНК за допомогою як комптонівських електронів, так і активних форм кисню, що утворюються внаслідок радіолізу води. В результаті активація таких білків-регуляторів геному, як p53, p21, призводить або до апоптозу клітин з ушкодженою ДНК, або до виключення цих клітин з клітинного циклу у фазу спокою G_0 . Як наслідок, зменшуються загальна кількість клітин, що поділяються, і загальний темп проліферації. Даний механізм, очевидно, спрацьовує при великій потужності дози та при великих дозах, коли в структурі ушкоджень ДНК переважають двониткові розриви, що не можуть піддаватися віднов-

ленню, і, відповідно, будуть стимулювати регуляторну систему геному до ліквідації цих клітин через апоптоз.

У разі впливу ж γ -випромінювання з малою потужністю дози, очевидно, меншою є і кількість ушкоджень ДНК за одиницю часу за рахунок короткоживучих комптонівських електронів. Активні форми кисню, що утворюються при радіолізі води, накопичуються – їхній період життя вищий і порівнянний з тривалістю опромінення. Однак при малій дозі опромінення (0,1 Гр) їхня кількість не сягає величини, здатної викликати значну кількість ушкоджень ДНК. Таким чином, можна припустити, що при малих дозах і потужності дози інтенсивність ушкодження ДНК настільки незначна, що в структурі її ушкоджень переважають одониткові розриви, котрі можуть репарувати, і, відповідно, механізми, що запускають апоптоз або відхід ушкоджених клітин у фазу G_0 , не включаються зовсім чи слабко виражені. Можна припустити, що активація регуляторів геному має певний поріг; при дозі 0,1 Гр і при даній потужності цей поріг не досягається. Таким чином, інтенсивність проліферації не буде послаблятися, у той час як поодинокі помилки в структурі ДНК будуть накопичуватися згодом, не призводячи до ініціації апоптозу. Водночас, очевидно, вогнище запалення, як система, намагаючись протистояти загибелі клітинного пулу, включає механізми, що посилюють диференціацію фібробластів з молодих, стовбурових, форм. Більше того, активні форми кисню, що утворюються внаслідок радіолізу води, аналогічні за структурою медіаторам запалення, що виробляються нейтрофілами та макрофагами, і впливають на проліферацію у вогнищі запалення. Таким чином, у цілому, буде спостерігатися посилення проліферації з наростаючою з часом кількістю клітин з помилками в структурі ДНК – потенційними претендентами на злоякісну трансформацію. Вищезгаданий механізм стиму-

ляції проліферації може спостерігатися й у разі опромінення з великою потужністю, однак інтенсивність апоптозу клітин з ушкодженою ДНК буде, очевидно, переважати над стимулювальним впливом з боку інших клітин у вогнищі запалення.

По-друге, виявлено, що низькоінтенсивне γ -випромінювання викликає значне зниження еміграції лімфоцитів у вогнище запалення. Очевидно, це явище може бути пов'язане з тим, що, як відомо, лімфоїдна тканина є найбільш чутливою до дії іонізуючого випромінювання, і зниження кількості лімфоцитів у вогнищі відображує їх зменшення в лімфоїдних органах і в крові при опроміненні. Обрані дози, особливо 0,5 і 1,0 Гр, як відомо, є достатніми для пригнічення лімфоцитопоезу, при яких зниження кількості лімфоцитів у вогнищі спостерігалось у всіх експериментальних серіях. Як відомо, лімфоцити здійснюють імунологічний нагляд, у т.ч. за потенційно злоскісними клітинами.

Отримані результати про стимуляцію проліферації фібробластів і макрофагів у вогнищі запалення з можливим накопиченням помилок у структурі ДНК при ослабленому імунологічному нагляді з боку лімфоцитів можуть непрямо вказувати на посилення онкогенного потенціалу вогнища хронічного запалення при дії низькоінтенсивного γ -випромінювання.

N.A. Klimenko, N.I. Onishchenko

THE EFFECT OF LOW DOSE-RATE γ -RADIATION ON CELLULAR CONTENT OF THE CHRONIC INFLAMMATORY FOCUS

On the model of chronic aseptic carrageenan-induced inflammation in rats it is shown that low dose-rate γ -radiation of

small dose (0.1 Gy) leads to the increase of fibroblast and macrophage proliferation in the inflammatory focus, and produces considerable decrease of lymphocyte emigration at all investigated radiation doses. Obtained data on stimulation of proliferation in the inflammatory focus with possible accumulation of DNA errors at depressed immunological supervision by lymphocytes can indirectly point to probability of oncogenic potential increase in the chronic inflammatory focus at low dose-rate γ -irradiation.

Kharkiv Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлакова Е.Б., Ерохин В.Н. Влияние низкоинтенсивного облучения в малых дозах на возникновение и развитие спонтанного лейкоза у мышей линии AKR // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2001. – **41**, № 4. – С. 385–388.
2. Клименко Н.А., Павлова Е.А. Проницаемость сосудов очага воспаления в облученном организме // Там же. – 1997. – **37**, №5. – С. 51–53.
3. Франкфурт О.С. Клеточный цикл в опухолях. – М.: Медицина, 1975. – 172 с.
4. Ames B.N., Swirsky Gold L., Willett W.C. The causes and prevention of cancer. – Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1995. – **92**. – P. 5258–5265.
5. Chernobyl 10 years on // Brit. Med. J. – 1996. – **312**. – P. 1052–1053.
6. Dreher D., Junod A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development // Eur. J. Cancer. – 1996. – **32A**. – P. 30–38.
7. Dyer R.D. Meeting report // Inflamm. Res. – 2002. – **51**. – P. 1071–1072.
8. Ghosh A.K., Hirasawa N., Niki H., Ohuchi K. Cyclooxygenase-2-mediated angiogenesis in carrageenan-induced granulation tissue in rats // J. Pharmacol. and Exp. Ther. – 2000. – **295**. – P. 802–809.
9. Murthy S., Winkler J.D. Inflammation and oncogenesis // Inflamm. Res. – 2002. – **51**. – P. 1076–1076.
10. Preston D., Hiroo K., Studies of the Mortality of A-Bomb Survivors. Report 8. Cancer Mortality 1950-1982 (RERF TR-1-86) // Radiat. Res. 111. – P. 151–178.