УДК 577.334

О.Б. Ганжа, Н.К. Родіонова, Г.А. Долинський, Л.В. Костюкова, М.О.Дружина

Неспецифічна стрес-реакція як показник радіочутливості організму

В статье представлены результаты о возможности прогнозирования индивидуальной радиочувствительности по типу ответной реакции организма на стрессовое воздействие (иммобилизация животных). Исследования проведены на крысах линии Вистар. Показано, что у радиочувствительных животных исходные показатели окислительного метаболизма выше, чем у радиорезистентных; нарушения про- и антиоксидантного равновесия после нерадиационного стресса чётко выражены и сохраняются продолжительное время. Для этих животных характерны лимфопения, нейтрофилёз. Отличия между типами ответной реакции у радиочувствительных и радиорезистентных животных обусловлены резервными возможностями кроветворной системы, состоянием природных депо зрелых клеток и ферментов антиоксидантной защиты.

ВСТУП

Прогноз індивідуальної радіочутливості важливий не лише з теоретичної точки зору, але й з практичної у зв'язку з тим, що багато людей мають контакт з іонізуючою радіацією як у результаті професійної діяльності, так і внаслідок аварійних ситуацій на об'єктах атомного виробництва [1, 4, 5]. Особливий інтерес представляє пошук показників, що дали б змогу оцінити (прогнозувати) радіочутливість організму. Індивідуальна радіочутливість, вірогідно, є проявом неспецифічної резистентності організму і тому слід знайти найбільш адекватні структури, реакції й оптимальні методи для її визначення.

З огляду на це, важливим є дослідження тих систем організму, що найчутливіші до дії екзогенних чинників, у тому числі й іонізуючої радіації. Насамперед до них можна віднести систему крові, яка швидко реагує на екстремальні стимули різної природи та являє собою інтегральне відображення метаболічних процесів усього організму, містить інформацію про процеси, які відбуваються не лише в ній, а й в інших органах і системах. За дії різних стрес-агентів однією з найбільш чутливих ланок метаболізму є про- та антиоксидне співвідношення [12, 13]. Тобто динаміка процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та функціонування ферментів антиоксидного захисту в крові свідчать про резервно-компенсаторні можливості організму. У зв'язку з цим мета нашого дослідження перевірити гіпотезу стосовно того, що неспецифічна стрес-реакція організму є значною мірою відображенням його реакції на опромінення.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 55 щурах-самцях лінії Вістар розведення віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького. Як стрес-агент застосовували іммобілізацію. Іммобілізаційний стрес у тварин формували протягом 18 год, для чого їх утримували в вузьких пластикових пеналах. Рентгенівське опромінення щурів здійснювали на апараті РУМ-17: напруга на трубці 200 кВ, струм 10 мА, фільтр 0,5 мм Cu + 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань 50 см, потужність експозиційної дози

© О.Б. Ганжа, Н.К. Родіонова, Г.А. Долинський, Л.В. Костюкова, М.О.Дружина

випромінювання 0,15 мА/кг, експозиційна доза 219,3 мКл/кг (8,5 Гр). Тварин обстежували до дії стресорів, через 10 хв після та на 1, 5, 7, 14-ту добу.

Для оцінки сумарної реакції-відповіді на дію стрес-агентів використовували наступні методи: хемілюмінесцентну (ХЛ) оцінку про- та антиоксидного співвідношення в системі крові [9], якісну та кількісну оцінку клітинного складу периферичної крові та кісткового мозку [8], визначення активності каталази [6].

Кров для досліджень забирали з хвостової вени щурів. Визначали кількість лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів меланжерно-камерним способом. Підраховували лейкограми та мієлограми, мазки фарбували за Паппенгеймом [8].

За тривалістю життя тварин ретроспективно розподіляли на радіочутливих та радіорезистентних і зіставляли їх реакцію на дію стрес-агентів – іммобілізацію та радіацію.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики на персональному комп'ютері за допомогою пакета програм Microsoft Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Індивідуальність реактивності організму яскраво проявляється при застосуванні підвищених функціональних навантажень. Для виявлення його компенсаторно-захисних можливостей з різними вихідними показниками окисного метаболізму застосовували радіаційні та нерадіаційні стресові чинники.

Залежно від тривалості життя після опромінення тварини в кінці експерименту були ретроспективно розподілені на дві групи – радіочутливі та радіорезистентні (рис. 1). Середня тривалість життя була 5±3 та 16 діб

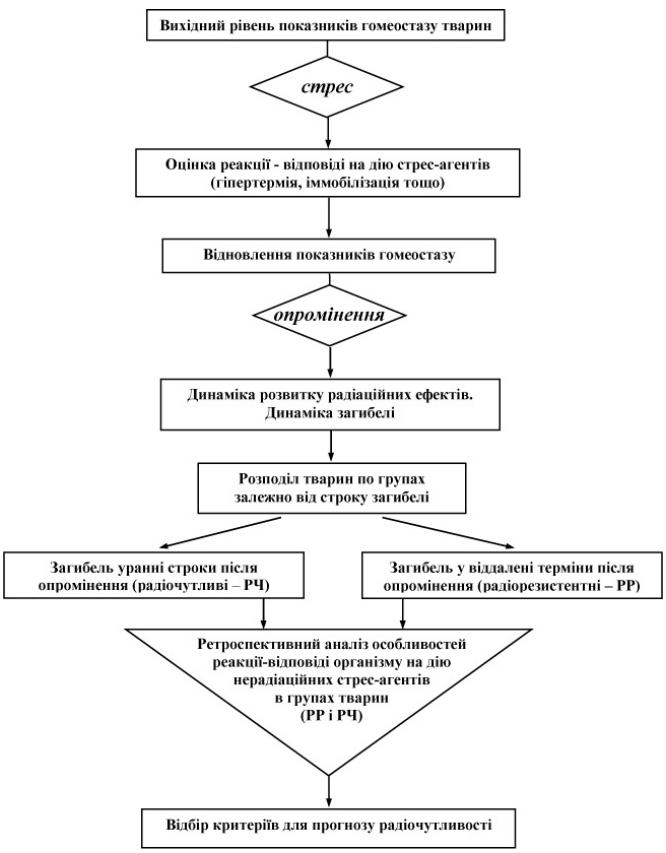

Рис. 1. Схема експерименту

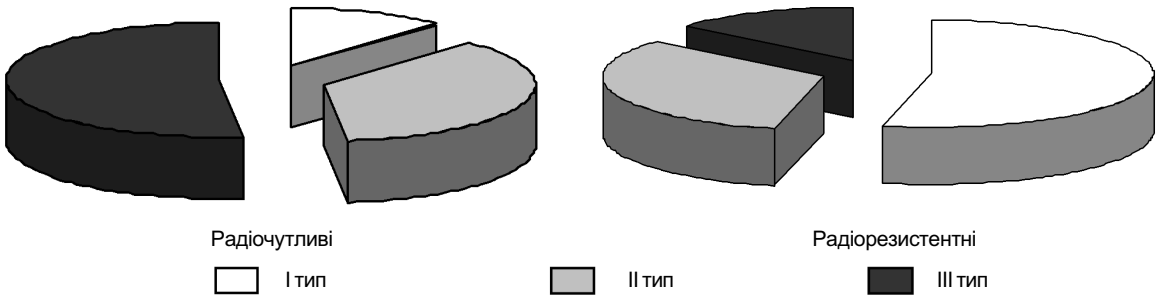

Рис. 2. Розподіл за типами реакції-відповіді кровотворної системи на дію іммобілізаційного стресу у щурів лінії Вістар залежно від їх радіочутливості: I тип – зниження вмісту лейкоцитів понад 50 %; II тип – кількісні зміни практично відсутні; III тип – збільшення вмісту лейкоцитів понад 50 %

± 4 доби для радіочутливих і радіорезистентних тварин відповідно ($P<0,05$).

Розподіл щурів за типом реакції-відповіді після дії іммобілізаційного стресу представлено на рис. 2. Для радіочутливих тварин характерною була реакція стресового типу зі зниженням вмісту лейкоцитів, а для радіорезистентних щурів, навпаки, відмічалася реакція зі збільшенням їх кількості [3].

При дослідженні змін окремих форм лейкоцитів показано, що для радіочутливих тварин є характерним поєднання лімфопенії з нейтрофільозом (рис. 3). На значимість співвідношення між цими форменими елементами вказують і інші авторів [7].

Чому саме така реакція є прогностично несприятливою? Для вирішення цього питання ми провели дослідження змін кістковомозкового кровотворення у тварин з діаметрально різним типом відповіді через 1 добу після дії стрес-агентів (рис. 4). Слід зазначити, що за типом відповіді, яка є характерною для радіочутливих тварин, відмічається зниження загальної клітинності кісткового мозку внаслідок суттєвого зменшення вмісту зрілих гранулоцитів та менш значного – за рахунок мієлоїдних елементів, що диференціюються. Кількість мітозів при цьому типі відповіді збільшується практично вдвічі. Тобто такий тип реакції може призвести до поступового виснаження системи кровотворення, зменшення з часом кількості стовбурових клітин, що є лімітуючим фактором виживання тварин після опромінення у великих дозах [10].

У радіорезистентних тварин, навпаки, відмічено збільшення загальної клітинності кісткового мозку за рахунок лімфоцитарної фракції. Ця реакція має захисний характер у зв'язку з тим, що лімфоцити (насамперед Т-лімфоцити) збільшують резистентність стовбурових клітин до опромінення [7].

На рис. 5 представлено зміни інтенсивності перекисних процесів у крові після іммо-

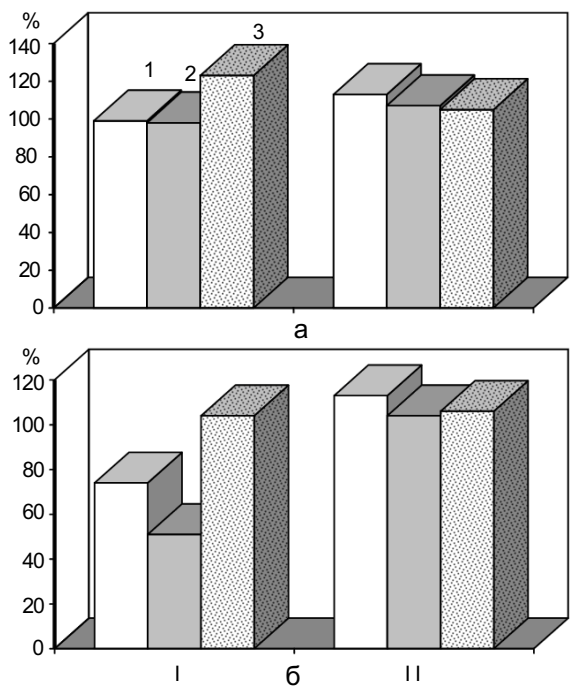

Рис. 3. Зміни вмісту лейкоцитів після іммобілізації у щурів з різною радіочутливістю, % від вихідних значень: а – через 10 хв; б – через 1 добу; I – радіочутливі; II – радіорезистентні. 1 – лейкоцити, 2 – лімфоцити, 3 – нейтрофіли

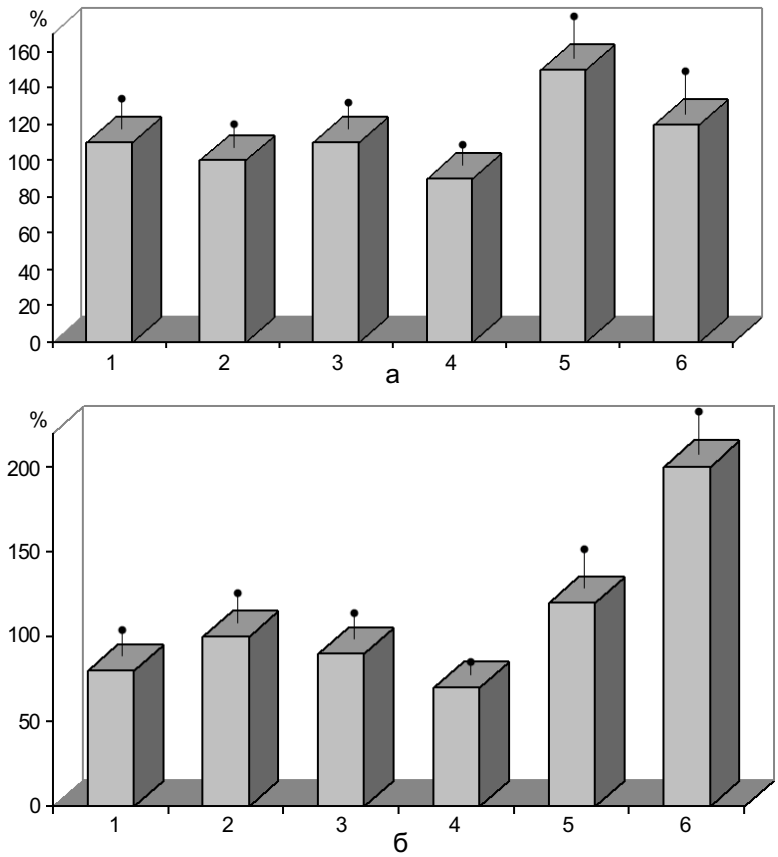

Рис. 4. Зміни клітинного складу кісткового мозку щурів лінії Вістар через 1 добу після дії стрес-агентів залежно від реакції-відповіді за вмістом лейкоцитів у периферичній крові, % від контролю: а – радіорезистентні тварини; б – радіочутливі тварини. 1 – кількість мієлокардіоцитів, 2 – деференційовані еритроцити, 3 – деференційовані гранулоцити, 4 – зрілі гранулоцити, 5 – лімфоцити, 6 – мітотичний індекс

білізаційного стресу в обох групах тварин.

При аналізі про- та антиоксидного співвідношення в крові окремих тварин виявлено варіювання значень показників кінетики ХЛ у нормі. Поряд з ними були також і тварини з більш вираженою стабільністю зазначених показників у динаміці. Очевидно, така варіабельність ХЛ-характеристик гемолізату крові зумовлена індивідуальними особливостями функціонування антиокисних систем організму, що обмежують швидкість ферментативного та неферментативного окиснення.

Для радіочутливих тварин характерне зменшення показників інтенсивності пероксидних процесів у периферичній крові відносно вихідних значень як через 10 хв, так і через 1 добу після стресу з

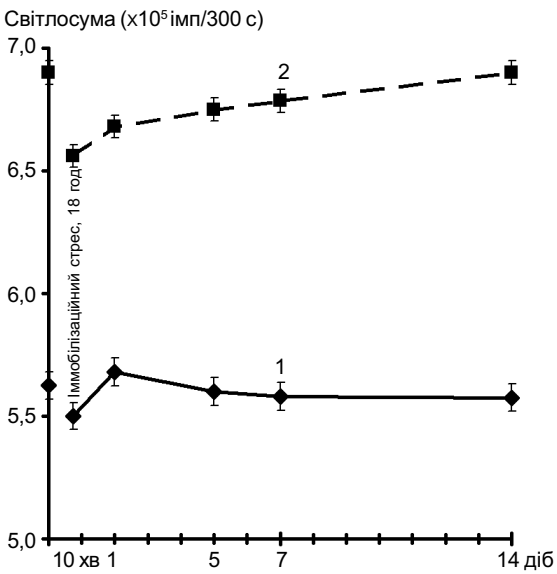

Рис. 5. Динаміка інтенсивності хемілюмінесценції в гемолізатах крові щурів після іммобілізаційного стресу: 1 – радіорезистентні тварини; 2 – радіочутливі тварини

повільним відновленням до 14-ї доби.

Радіорезистентним тваринам притаманними були відносно стабільні значення показників про- та антиоксидного співвідношення як до, так і після іммобілізаційного стресу. Для них характерне швидке відновлення вихідних значень, що відбувається внаслідок активації ферментів антиоксидного захисту та ефективної взаємодії вільних радикалів з низькомолекулярними антиоксидантами [2]. Це вказує на те, що у тварин даної групи високі компенсаторно-відновні можливості організму, які в змозі протидіяти порушенню окисно-відновної рівноваги після дії стрес-агентів, що підтверджується значеннями активності ключового ферменту антиоксидного захисту – каталази (рис. 6). Радіочутливі тварини мали удвічі вищі вихідні значення каталазної активності, ніж радіорезистентні тварини ($P<0,001$). Після іммобілізаційного стресу у них знижується активність каталази, що за першу добу сягає 40 % відносно вихідного рівня ($P<0,001$), а надалі цей показник поступово відновлюється. Після опромінення (8,5 Гр) спостерігали також різке зниження активності каталази, яка через 1 добу була втричі меншою за вихідне значення ($P<0,001$) і надалі знижувалась аж до загибелі тварин. Це вказує на те, що у радіочутливих тварин резервні можливості організму протидіяти порушенню окисно-відновної рівноваги після дії іонізуючого випромінювання значно обмежені [11].

У радіорезистентниих тварин після іммобілізації активність каталази порівняно з радіочутливими тваринами дещо підвищується тільки в першу добу ($P>0,05$) і далі не відрізняється від вихідних значень. Після опромінення у них спостерігали повільне зниження активності цього ферменту до 60 % від вихідного рівня на 5-ту добу ($P<0,01$), що свідчить про більш значні порушення окисного метаболізму в організмі тварин за дії іонізуючого випромінювання порівняно з іммобілізаційним стресом [14]. Але вже на 8-му добу цей показник повертався до вихідних значень.

Аналізуючи наведені вище результати слід відмітити, що за типом реакції на стрес-агенти можна прогнозувати чутливість тварин до дії радіації.

Відмінності між типом відповіді за гематологічними показниками у радіочутливих і радіорезистентних тварин, імовірно, зумовлені резервними можливостями системи кістковомозкового кровотворення, зокрема кількістю депонованих зрілих

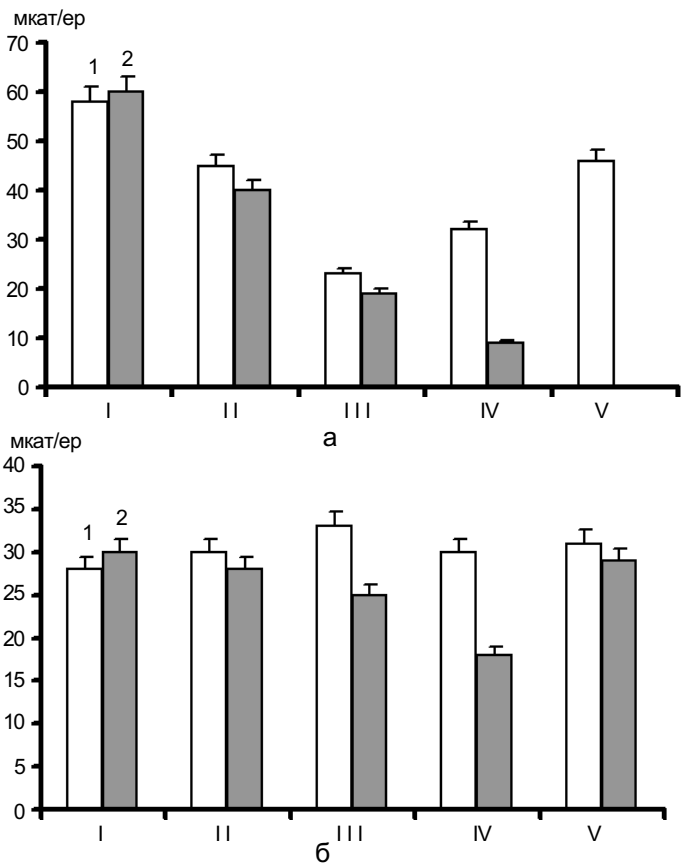

Рис. 6. Типова динаміка зміни активності каталази в крові щурів після іммобілізаційного стресу (1) та опромінення в дозі 8,5 гр (2): а – радіочутливі, б – радіорезистентні; I – вихідний стан, II – 10 хв, III – 1 доба, IV – 5 діб, V – 7 діб

клітин. Їх високий вміст збільшує шанс виживання тварин в умовах значного дефіциту зрілих клітин периферичної крові за екстремальних умов.

Неспецифічна резистентність організму, відображаючи можливості компенсаторно-захисних систем, що проявляються в змінах окисного метаболізму, є, за нашими результатами, основною складовою реакції-відповіді як для іммобілізаційного стресу, так і опромінення.

Слід зазначити, що радіочутливість зумовлена багатьма факторами. Використання інших тестів може допомогти виявити додаткові значущі показники та істотно підвищити точність прогнозування.

ВИСНОВКИ

1. За типом реакції-відповіді системи крові на іммобілізаційний стрес можна прогнозувати чутливість тварин до наступних радіаційних впливів, тобто, неспецифічна реактивність організму може визначати його радіочутливість.

2. У радіочутливих тварин вихідні показники окисного метаболізму значно вищі, ніж у радіорезистентних тварин.

3. Окисний метаболізм у радіорезистентних тварин як за дії іммобілізаційного стресу, так і іонізуючого випромінювання не зазнає значних змін і швидко приходить до норми, порівняно з радіочутливими тваринами.

4. Після дії стрес-агента для радіочутливих тварин є типовою реакція із значним нейтрофільозом і лімфопенією, для резистентних тварин – відсутність нейтрофільозу, збільшення кількості лімфоцитів.

5. Відмінності між типом реакції-відповіді за гематологічними показниками та змінами окисного метаболізму у радіочутливих і радіорезистентних тварин визначаються резервними можливостями системи кістковомозкового кровотворення, станом природних депо зрілих клітин і ферментів антиоксидативного захисту: високий рівень резерву та захисно-компенсаторних реакцій підвищує шанс виживання в екстремальних умовах.

O.B. Ganzha, N.K. Rodionova, G.A. Dolynskyy, L.V. Kostyukova, M.O. Druzhyna

NON-SPECIFIC STRESS-REACTION AS INDICATOR OF RADIOSENSITIVITY

The data presented demonstrate possible personal radiosensitivity prognosis according to the immobilization stress response (animal model). It was demonstrated on the Wistar rats that in radiosensitive animals initial oxidative metabolism parameters were higher than in radioresistant ones, and prooxidant-antioxidant balance alteration after non-radiation stress were more evident and kept for a longer period. Those animals had had limphopenia and neutrophilosis. The differences in the response types between radiosensitive and radioresistant animals were due to the blood system reserve abilities, as well as the state of natural mature cells depot, and antioxidant defence enzymes.

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы. – К.: Фитосоциоцентр, 2006. – 424 с.
2. Біохімічні порушення та їх корекція в організмі ссавців, які живуть у Чорнобильській зоні відчуження / М.О. Дружина, А.П. Бурлака, Н.П. Моісеєва та ін. // Чорнобиль. Зона відчуження: Збірн. наук. праць НАНУ. – К.: Наук. думка, 2001. – С. 521–525.
3. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов-на-Дону: Изд-во Ростов. ун-та, 1990. – 223 с.
4. Грикоркина Е.Б. Биологические характеристики и экологические факторы, определяющие радиорезистентность мелких млекопитающих отряда Rodentia // Радиац. биология. Радиоэкология. – 2004. – **44**, №3. – С. 245–250.
5. Даренская Н.Г., А.О. Короткевич. Неспецифическая реактивность организма и принципы формирования индивидуальной резистентности: (подходы к прогнозированию ранних и ближайших последствий воздействия ионизирующего излучения). – М.: Воентехиниздат, 2001. – 240 с.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.
7. Лозинская И.Н., Никифорова Н.А., Москаленко И.П. Индивидуальные особенности пострадиационной реакции циклических нуклеотидов тимоцитов крыс // Радиобиология. – 1992. – **32**, №2. – С. 218–221.

8. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям / Осн. В.Е. Предтеченским. Под. ред. Л. Г. Смирновой, Е. А. Коста. – М.: Медгиз, 1960. – 963 с.
9. Серкиз Я.И., Дружина Н.А., Хриенко А.П. и др. Хемилюминесценция крови при радиационном воздействии. – К.: Наук. думка, 1989. – 176 с.
10. Demopoulus H.B. The basis of free radical pathology // Fed. Proc. – 2003. – **32**, №8. – P. 1903–1908.
11. Lee T.B., Lim D.Y., Jeon H.J. et al. Differential induction of Mn-containing superoxide dismutase by paraquat in peripheral lymphocytes of normal subjects and gastric cancer patients // Mol. Cells. – 2003. – **16**, № 1. – P. 13–18.
12. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death // Drug Metab. – 2007. – **39**, №2. – P. 443–455.
13. Ray G., Husain S.A. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis // Indian J. Exp. Biol. – 2002. – **40**, №11. – P. 1213–1232.
14. Tulard A., Hoffschir F., de Boisferon F.H. et al. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – **35**, №1. – P. 68–77.

Ін-т експерим. патології, онкології та радіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 06.11.2007