

ВПЛИВ НИЗЬКОДОЗОВОГО ГАМА-ОПРОМІНЕННЯ НА БІЛКИ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ

**Вол.І. Малюк, Г.Г. Репецька, Вік.І. Малюк,
Т.В. Рибальченко, С.В. Сур, М.В. Макаренко, І.В. Малюк**
*Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця*

Вступ

Іонізуюча радіація впливає на синтез і співвідношення білкових фракцій в плазмі крові тварин. Ще ранніми дослідженнями відмічено зменшення альбуміну і збільшення глобуліну (особливо альфа1- фракції), що призводить до зниження коефіцієнту альбумін/глобулін, гальмування синтезу пропердіну і антитіл. [1]. Радіаційне пошкодження білків полягає в зменшенні їх молекулярної маси внаслідок фрагментації поліпептидних ланцюгів, порушенні вторинної і третинної структури, агрегації, інактивації ферментів [2]. При X-опроміненні щурів в дозі 600Р спостерігається збільшення альфа1-глікопротеїнів і зменшення бета-глікопротеїнів сироватки крові [3]. В цитованих і багатьох інших роботах подібні зміни спостерігалися при летальних і супралетальних дозах одноразового опромінення. Загальноприйнято вважати, що при сублетальних дозах опромінення пошкодження білків незначне, і лише при масивних дозах, коли про виживання не може бути мови, прямі пошкодження білків набувають такого масштабу, що можуть бути зареєстровані звичайними методами [4]. Що стосується впливу низькодозового (до 1 Гр) опромінення, то такі роботи нечисленні. При одноразовому X-опроміненні мишей в період росту дозами 0,25 - 2,0 Гр не було виявлено помітних змін електрофореграм сироватки крові [5].

Проте, дослідження в такому напрямку є актуальними, тому що в умовах екологічної кризи окремі контингенти мають тривалий контакт з низькодозовими іонізуючими випромінюван-

нями. До них належать мешканці місцевостей з підвищеним вмістом радону в житлових приміщеннях, працівники уранових копалень, мешканці територій, забруднених радіонуклідами після Чорнобильської катастрофи 1986 року тощо. Щоб наблизити умови дослідів до реальних, ми запланували субхронічний експеримент з фракціонуванням гама-опромінення лабораторних тварин. Враховуючи отримані нами раніше дані про радіопротекторні властивості малату натрію [6], ми використали цей препарат в даній роботі.

Матеріал та методи дослідження

Досліди проведені на 36 білих щурах-самцях лінії Вістар вагою 150-240 г, поділених на 6 груп: 1) контроль, 2) опромінення в сумарній дозі 0,15 Гр, 3) опромінення в сумарній дозі 0,30 Гр, 4) опромінення в сумарній дозі 0,45 Гр, 5) введення малату натрію з питною водою щодобово по 100 мг/кг, 6) опромінення в сумарній дозі 0,45 Гр і введення малату натрію з питною водою щодобово по 100 мг/кг. Загальне гама-опромінення тварин проводили за допомогою апарата "Рокус" (джерело Co^{60}). Щурів опромінювали двічі на тиждень на протязі одного з половиною тижнів до досягнення сумарної дози 0,15 Гр (3 сеанси опромінення по 0,05 Гр кожний), трьох тижнів до досягнення сумарної дози 0,30 Гр (6 сеансів опромінення по 0,05 Гр кожний) та півтора тижня для досягнення сумарної дози 0,45 Гр (3 сеанси опромінення по 0,15 Гр кожний). Потужність доз складала 0,83 Р/с. Кров брали у тварин наступної доби після останнього опромінення і останнього одержання ними малату натрію.

Білкові фракції сироватки крові досліджували за допомогою рідинного хроматографа "System Gold" (Бекман, США): помпа 116, детектор 1G6, мікрокомп'ютер NEC PC-8300, самописець BD-40. Колонка: Sphergel TSK 3000 SW, 40 мкл, 7,0 - 300 мм. Рухома фаза: 0,04 моль фосфатний буфер в 0,3 моль розчині NaCl (рН 6,8). Швидкість 1,0 мл/хв. Сироватку крові розводили буферним розчином у 20 разів, розведену сироватку в кількості 20 мкл вводили в колонку. Були ідентифіковані піки Ig M, Ig A, Ig G, альбуміну, а також фрагментів меншої молекулярної маси ($f < 10000$, $f < 5000$ і $f < 1000$). Площу кожно-

го окремого піку на хроматограмі виражали в % від сумарної площі всіх піків, яку приймали за 100%. Результати обробляди статистично за Стьюдентом.

Отримані результати та їх обговорення

Попередні досліді показали, що основним фактором, що визначав результати, була сумарна доза фракціонованого опромінення. Інші фактори фракціонованого опромінення (потужність дози, тривалість індивідуальних сеансів і цілого курсу опромінення) мали менше значення. Тому тут наведені одержані результати в залежності від сумарної дози опромінення (табл. 1).

Аналіз одержаних результатів показав, що фракціоноване загальне гама-опромінення у вище вказаних режимах і дозах призвело до певних достовірних змін співвідношень білкових фракцій сироватки крові в порівнянні з контролем (інтактні тварини). Так, при опроміненні в дозі 0,15 Гр виявлено зменшення фракції альбуміну на 9% по відношенню до контролю і збільшення фрагментів молекулярної маси менше 5000 на 78% по відношенню до контролю. При опроміненні в дозі 0,30 Гр фракція IgM зменшилась на 16% по відношенню до контролю. При опроміненні в дозі 0,45 Гр було відмічено зниження фракції альбуміну на 7% по відношенню до контролю, і значне підвищення фрагментів молекулярної маси менше 5000 - на 81% по відношенню до контролю. Результати досліджень, таким чином не виявили істотного впливу малату натрію на білкові фракції сироватки крові щурів. Однак звертає на себе увагу той факт, що при опроміненні в дозі 0,45 Гр і одночасному введенні малату натрію зникли ті зміни, які були виявленні при опроміненні в дозі 0,45 Гр без малату.

Отже, було відмічено помірне зменшення фракції альбуміну і збільшення фракції фрагментів $I < 5000$, тобто зміни такої ж спрямованості, але кількісно менші, ніж наведені в літературі при великих дозах опромінення. Дозової залежності цих змін в наших дослідіах не виявлено.

Ізольовані білки крові досить стійкі проти зовнішнього гама-опромінення. Гама-опромінення ізольованого альбуміну в дозах до 30 кГр не спричиняло помітних змін структури і хімічних характеристик цього білку [7].

Таблиця 1

Вміст деяких імуноглобулінів та альбуміну сироватки крові щурів після фракціонованого гама-опромінення (Co^{60})

Варіанти досліді	Вміст (площа піку, %)						
	Ig M	Ig A	Ig G	Альбумін	F<10000	F<5000	F<1000
Контроль	8,22±0,55	5,57±0,23	25,72±1,00	53,59±1,03	2,47±0,17	2,85±0,32	1,63±0,07
Опромінення (сумарна доза 0,15 Гр за три опромінення - загальний термін опромінення півтора тижні)	7,91±0,80	5,00±0,55	28,64±1,85	48,66±1,55*	2,77±0,24	5,09±0,48*	1,96±0,18
Опромінення (сумарна доза 0,3 Гр за шість опромінення - загальний термін опромінення три тижні)		5,98±0,26	25,79±0,78	53,62±0,47	3,04±0,20	3,25±0,31	1,39±0,09
Опромінення (сумарна доза 0,45 Гр за три опромінення - загальний термін опромінення півтора тижні)	7,47±0,23	5,43±0,44	27,30±1,02	50,04±0,25*	2,57±0,22	5,18±0,70*	1,96±0,18
Малат натрію, 100 мг/кг щодобово 2,5 тижні	7,93±0,25	6,23±0,62	25,60±0,91	51,80±1,05	2,30±0,38	3,38±0,35	1,80±0,16
Опромінення (сумарна доза 0,45 Гр за три опромінення - загальний термін опромінення півтора тижні) + малат натрію, 100 мг/кг щодобово 1 тиждень до опромінення та на протязі всього терміну опромінення	7,49±0,35	5,79±0,39	27,65±1,45	51,81±1,28	2,65±0,14	3,04±0,24	1,48±0,05

Примітка. * - різниця статистично достовірна при порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Ліофілізований людський імуноглобулін G (IgG) зберігав свою реактивність після гама-опромінення в дозах від 15 до 25 кГр [8]. При досліджуванні впливу терміну зберігання на цільну

кров, її опромінювали в дозі 30 Гр, а потім зберігали протягом 14 днів. Вміст гемоглобіну в плазмі опромінених і контрольних зразків суттєво не відрізнявся протягом 5 днів зберігання, але різниця була суттєвою через 14 днів [9]. В узагальнюючому огляді Міжнародного Агентства з Атомної Енергії за 1997 рік наведено багато інших даних про значну радіорезистентність білків крові при гама-опроміненні *in vitro* [10]. Новіші дослідження загалом підтверджують ці дані, зокрема, порушення структури (перетворення бета-спіралі в бета-складки), фрагментацію і зниження молекулярної маси бичого сироваткового альбуміну при гама-опроміненні його розчину в дозах 0,5, 1 і 5 кГр [11]. Виявлено зниження різних ізотипів IgG в різні терміни після гама-опромінення мишей в дозі 10 Гр [12]. Необхідно ще раз підкреслити, що уявлення про радіорезистентність білків виникли в результаті досліджень з опроміненнями переважно *in vitro* і значна кількість таких робіт виконані на препаратах ізольованих білків.

Що ж до впливу іонізуючої радіації *in vivo*, то тут створюється дещо інше враження, а саме, про значну чутливість білоксинтезуючих органів, кліткових систем і білкового складу крові до опромінення в нелетальних дозах. Так, в огляді [13] показані складні і глибокі зміни всіх органів і систем і, в першу чергу, системи імунітету. Ці зміни виникають при сублетальних і низькодозових опроміненнях і мають як кількісний, так і якісний характер. При обстеженні людей, опромінених в період Чорнобильської катастрофи 1986 року, в крові виявлено зниження концентрації антиоксидантів, підвищення вільних радикалів, збільшення рівня IgE, збільшення активності нейтрофілів [14]. Опромінення лабораторних щурів та мишей в дозах 1,2 - 2,22 Гр викликало порушення червоного і білого кровотворення, лейко- і лімфоцитопенію, зниження кількості клітин, що містили IgG та Fc-рецептор [15]. При гама-опроміненні щурів в дозах 0,1, 0,5 і 1 Гр кількість лімфоцитів у вогнищі експериментального хронічного запалення достовірно зменшувалась, а міграція лімфоцитів і лімфоцитопоез пригнічувались; при одноразовому опроміненні ці порушення зникали через 1-3 доби, а при фракціонованому опроміненні -

лише через 1 місяць [16]. Отримані нами дані про помітну радіочутливість білкового складу крові щурів узгоджуються з наведеними вище сучасними даними.

Висновок

В світлі наведених вище даних ясно, що виявлені в наших дослідах зміни є результатом не прямої, а опосередкованої дії опромінення. Ймовірно, вони залежали від загальних нейрогуморальних механізмів радіаційного пошкодження, в тому числі змін співвідношень між швидкістю синтезу і деградації окремих білкових фракцій сироватки крові.

Література

1. Бак З. Основы радиобиологии / З. Бак, П. Александре. - М.: ИИЛ, 1963. - С. 312-313.
2. Куна П. Химическая радиозащита / П.Куна. - М.: Медицина, 1989. - С.16.
3. Олецкий Е.И. Влияние общего X-облучения на содержание гликопротеинов сыворотки крови у нормальных и гипотиреоидных животных / Е.И. Олецкий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1965. - Том 60, № 8. - С. 54-56.
4. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений / Д.М.Гродзинский. - Киев: Наукова думка, 1989. - С. 146-147.
5. Konermann G. Postimplantation defects in development following ionizing radiation in *Advances in radiation biology* / G.Konermann. - New York: Academic Press, 1987. - 128 p.
6. Аверина С.А. Малат натрия уменьшает выраженность радиационной лейкоцитопении / С.А.Аверина, В.И. Малюк // Третий съезд по радиац.исслед. : тез.докл. - Пушино, 1997. - Т.2. - С.158-159.
7. Alva L.L.M. Esterilizacion del plasma normal humano y algunas de sus fracciones por medio de radiaciones gamma / L.L.M.Alva, M.C.Cortina // Radiosterilization of Medical Products, International Atomic Energy Agency (Symp. Proc., Budapest 1967). - Vienna, 1967. - P. 125-135.
8. Gergley J. Studies of gamma-ray-irradiated human immunoglobulin G / J.Gergley, G.A.Medgyesi, A.Igali //

Radiosterilization Medical Products, International Atomic Energy Agency, (Symp. Proc., Budapest, 1967). - Vienna, 1967. - P. 115-124.

9. Ramirez A.M. High potassium levels in stored irradiated blood / A.M.Ramirez, D.O.Woodfield, R.Scott, J.McLachlan // *Transfusion*. - 1987. - V. 27. - P. 444-445.

10. Effect of ionizing radiation on blood and blood components: a survey. - Vienna: IAEA 1997. - P. 25-26.

11. Gaber M.H. Effect of γ -Irradiation on the Molecular Properties of Bovine Serum Albumin / M.H.Gaber // *J. of Bioscience and Bioengineering*. - 2005. - Vol. 100, № 2. - P. 203-206.

12. Goel H.C. Podophyllum hexandrum modulates gamma radiation-induced immunosuppression in Balb/c mice: Implication in radioprotection / H.C.Goel, H.Pracash, A.Ali // *Molecular and cellular biochemistry*. - 2007. - V. 295, № 1-2. - P. 93-103.

13. Некоторые особенности иммунного ответа под влиянием различных доз ионизирующего облучения у животных и человека / Т.И.Коляда, С.В.Брусник, И.Д. Андреева [и др.] // *Annals of Mechnicov Institute*. - 2007. - № 3. - С.17-22.

14. Медико-социальные последствия ядерных катастроф / Н.В.Васильев, В.И.Мальцев, В.Н.Коваленко [и др.]. - Киев : Здоров'я, 1999. - 148 с.

15. Савцова З.Д. Кооперативные иммунные реакции у различных поколений мышей / З.Д.Савцова, С.А.Ковбасюк, О.Ю.Юдина // *Радиационная биология. Радиоэкология*. - 1991. - Том 31, № 5. - С. 679-686.

16. Клименко М.О. Вплив низькоінтенсивного γ -випромінювання на клітинний склад вогнища хронічного запалення / М.О.Клименко, М.І.Онищенко // *Фізіол. журнал*. - 2004. - Том 50, № 6. - С. 673-677.

Резюме

Малюк Вол.І., Репецька Г.Г., Малюк Вік.І., Рыбальченко Т.В., Сур С.В., Макаренко М.В., Малюк І.В. Вплив низькодозового гамма-опромінення на білки сироватки крові щурів.

Після фракціонованого гамма-опромінення (Co^{60}) білих щурів-самців Вістар в сумарних дозах 0,15 - 0,45 Гр було виявлено зменшення фракцій альбумінів, імуноглобулінів М і збільшення фракції фрагментів молекулярної маси <5000. Дозової залежності цих змін не виявлено.

Ключові слова: фракціоноване низькодозове гамма-опромінення, альбуміни, імуноглобуліни, білі щурі, сироватка крові.

Резюме

Малюк Вол.І., Репецкая А.Г., Малюк Вик.И., Рыбальченко Т.В., Сур С.В., Макаренко М.В., Малюк И.В. Влияние низкодозового гамма-облучения на белки сыворотки крови крыс.

После фракционированного гамма-облучения (Co^{60}) белых крыс-самцов Вистар в суммарных дозах 0,15 - 0,45 Гр было выявлено уменьшение фракций альбуминов, иммуноглобулинов М и увеличение фракции фрагментов молекулярной массы <5000. Дозовой зависимости этих изменений не выявлено.

Ключевые слова: фракционированное низкодозовое гамма-облучение, альбумины, иммуноглобулины, белые крысы, сыворотка крови.

Summary

Maliuk Vol.I., Repetska G.G., Maliuk Vic.I., Rybalchenko T.V., Sur S.V., Makarenko M.V., Maliuk I.V. Low dose gamma-irradiation effects on rat blood serum proteins.

After fractional gamma-irradiation (Co^{60}) of male albino rats Wistar with doses 0.15 - 0.45 Gy the decrease of liquid chromatographic fractions of albumin and immunoglobulin M and increase of fragments <5000 in blood serum resulted. There were no dose dependencies of these changes.

Key words: fractional low dose gamma-irradiation, albumin, immunoglobulins, albino rats, blood serum.

Рецензент: д.біол.н., проф.Б.П.Романюк