

УДК 577.34

Г. О. Ушакова, О. О. Приходько, В. В. Лизогубов, В. С. Усенко

*Дніпропетровський національний університет,
Морфологічна лабораторія БІОНТЕК, Дніпропетровськ,
Дніпропетровське відділення Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України*

ЕФЕКТ ДІЇ ФРАКЦІОНОВАНОГО ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ В МАЛІЙ ДОЗІ НА ЩИТОВИДНУ ЗАЛОЗУ ЩУРІВ

Визначено вплив фракціонованого іонізуючого опромінення в дозі 0,25 Гр на щитовидну залозу щурів. Установлено зниження проліферативної активності тироцитів, що може призвести до віддалених ефектів порушення функцій щитовидної залози та біохімічних процесів, що регулюються тиреоїдними гормонами. Додатковий вплив будь-якого мутагенного фактора може призвести до розвитку пухлин у щитовидній залозі.

The effect of fractionated X-irradiation by 0.25 Gy dose to rat thyroid gland was studied. It was shown the decrease of thyrocyte proliferative activity that can induce the late effect of pathogenesis to thyroid gland and biochemical pathways that control by thyroid hormones. Additional effect by any mutagenic factor may induce thyroid tumor development.

Вступ

Проведення фундаментальних досліджень, спрямованих на встановлення основних закономірностей виникнення та розвитку патологічних змін в організмі людей і тварин, які зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС і перебувають в умовах дії різноманітних радіаційних і нерадіаційних шкідливих факторів, дуже важливе для України, оскільки дає змогу розробити нові методи діагностики, профілактики й лікування шкідливих наслідків, зумовлених зазначеними чинниками. Ці розробки пов'язані з тим, що порівняно з доаварійним періодом зросла частота виникнення злоякісних новоутворень, встановлено зміни рівня та структури захворювань серед дорослого контингенту, який було евакуйовано, і населення забруднених радіонуклідами територій [1; 14].

Оцінюючи наслідки аварії на Чорнобильській АЕС, треба брати до уваги весь комплекс факторів, від яких постраждали люди: радіонукліди на забруднених територіях, де проживають сотні тисяч людей; відокремлений та комбінований вплив радіації з іншими факторами фізичної, хімічної та біологічної природи на організм, що викликає ряд шкідливих наслідків; постійний психогенний стрес; нестача чистих продуктів і вітамінів; незадовільний стан елементарних побутових потреб.

Незважаючи на відносно велику кількість робіт і час, протягом якого вивчалася біологічна дія іонізуючої радіації, і досі немає повної ясності щодо механізму її дії, особливо у випадку низьких доз і рівнів, що не дозволяє до кінця вирішити навіть питання про порогові рівні, які викликають біологічні ефекти і, нерідко, про сам характер цих ефектів [2; 6]. Видатний шведський радіобіолог Р. М. Зіверт ще в середині двадцятого сторіччя дійшов висновку, що для дії радіації на живі організми немає порогового рівня.

Пороговим можна назвати такий рівень, нижче якого не визначається ураження у кожного опроміненого організму – так званий детермінований (визначений) ефект. При опроміненні в менших дозах ефект буде стохастичним (випадковим), тобто зміни у функціонуванні організму серед групи опромінених обов'язково виникнуть, але в кого саме – наперед невідомо.

© Ушакова Г. О., Приходько О. О., Лизогубов В. В., Усенко В. С., 2005

Крім цього, досі мало вивчені механізми (особливо у випадку малих доз), які охоплюють процеси репарації. Серед сформованих сучасною наукою питань про негативний вплив малих доз радіації на живий організм треба, у крайньому разі, перерахувати наступне:

- вплив так званих малих мутацій, які досі не враховуються в потрібній мірі при вивченні генетичних ефектів радіації (таких мутацій може бути у багато разів більше, ніж при вивченні в експериментах на тваринах і врахованих при яскраво виражених спадкових захворюваннях людини);
- вплив збільшеної радіочутливості деяких етапів розвитку статевих клітин і деяких ранніх етапів ембріонального розвитку людини;
- вплив опромінення в малих дозах на виникнення спадкових онкологічних захворювань;
- віддалені наслідки локального зовнішнього та внутрішнього опромінення.

Серед інших відомих проявів дії радіації на організм людини відома поява онкологічних захворювань у більш молодому віці (акселерація або омолодження раку), фізіологічні розлади (порушення роботи щитовидної залози тощо), серцево-судинні захворювання, алергії, хронічні захворювання дихальних шляхів.

З'ясувалось також, що дія радіації на здоров'я може залежати від тривалості опромінення: одна й та сама доза радіації, яка отримується за короткий проміжок часу, викликає менші ураження, ніж доза, яку організм отримав за довгий термін.

Потрібно зазначити також, що післядія опромінення може виявитися не одразу, а через декілька (іноді декілька десятків) років. Цей, так званий латентний, період для різних видів раку складає 5–20 років, для гіперпаратиреозу людини – від 27 до 52 років [7; 9].

Мета даної роботи – виявити зміни загальної морфології щитовидних залоз щурів, проліферативної активності тироцитів, а також стану С-клітин після фракціонованого опромінення в дозі 0,25 Гр.

Матеріал і методи досліджень

В експерименті використано 42 щури лінії Wistar вагою 170–200 г. Тварин утримували при +26°C і вологості повітря 60 % у контрольованих світлових умовах, їжа та вода були доступні *ad libitum*. Тварини були опромінені фракціоновано по 0,01 Гр/добу протягом 25 діб на апараті РУМ–17 (напруга 150 кВ, сила струму 6 мА, фільтр *Si* 2 мм, фокусна відстань 181 см, потужність дози 0,26 сГр/хв.). Опромінені щури розділені на шість груп: 1-а – контроль, 2–6-а експериментальні групи поділялися залежно від часу, що минув після закінчення дії радіації (1, 12 і 24 годин, 5 та 7 діб).

Тварин декапітували під гексаналовим наркозом (30 мг/кг ваги тіла), проводили видалення трахеогортанного комплексу, який фіксували у рідині Буена. Видалені щитовидні залози були дегідратовані у спиртах зростаючої концентрації. Використовуючи метилбензоат як проміжне середовище, матеріал заливали в парапласт. Блоки встановлювали в сагітальному спрямуванні та виготовляли серединні зрізи долі щитовидної залози товщиною 5–7 мкм на мікротомі МПС–2. Загальну морфологію щитовидної залози вивчали на гістологічних препаратах, забарвлених за Слінченко. Кількість проліферувальних клітин і С-клітини щитовидної залози визначали на препаратах, забарвлених непрямим імуногістохімічним методом із застосуванням антитілу до ядерного антигена клітинної проліферації (ЯАКП) та кальцитоніну, відповідно, та авідин-біотинової системи (Sigma) [12; 13].

Препарати (проліферувальні клітини), забарвлені імуногістохімічним методом за допомогою антитіл до ЯАКП, морфометрували. Морфометрію проводили за допомогою світлової мікроскопії на мікроскопі «Ахіорлан» при збільшенні $\times 40$ [8].

Розрахунок числа клітин, які діляться або готуються до ділення на 1 мм^2 площі зрізу ($N_{\text{мм}^2}$), проводили за формулою:

$$N_{\text{мм}^2} = N / S_{\text{кв}},$$

де $N_{\text{мм}^2}$ – кількість ЯАКП-позитивних ядер тироцитів у полі зору мікроскопа, обмеженому окулярною вставкою; $S_{\text{кв}}$ – площа окулярної вставки ($S_{\text{кв}} = 0,12 \times 0,12 \text{ мм} = 0,0144 \text{ мм}^2$).

Препарати, забарвлені імуногістохімічним методом за допомогою антитіл до кальцитоніну, тобто С-клітини щитовидної залози, морфометрували комп'ютерним методом Image аналізу. З кожного препарату, в якому були знайдені С-клітини, робили 9 зображень, які спеціальним чином оброблялися за допомогою макросу. Вивчали зміни таких параметрів як площа, яку займають С-клітини (area), щільність імуногістохімічного забарвлення (density) [10].

Отримані дані оброблені з використанням програмного пакета Statistica: розраховано статистично достовірні різниці за критерієм Стюдента (t -тест) та критерієм Фішера (F -тест) при рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

При дослідженні тварин контрольної групи у щитовидній залозі спостерігалися переважно дрібні фолікули з невеликою кількістю колоїду.

Кількість тироцитів, що експресували ЯАКП, становила близько $10,10 \pm 1,96$ клітин/ мм^2 площі всієї тиреоїдної паренхіми. Кількість С-клітин у залозі становила $745,4$ клітин/ мм^2 площі центральної зони тиреоїдної паренхіми. Середня площа однієї С-клітини становила близько $84,6 \text{ мкм}^2$. Рівень прозорості клітин за вибраною схемою становив близько $1,9$ умовних одиниць. Співвідношення найбільшого та найменшого розміру С-клітин складало $1,8$.

Дослідження щитовидної залози опромінених тварин через 12 годин після закінчення всього курсу опромінення вказують на те, що епітелій щитовидної залози, що мав експресію ЯАКП, достовірно знижувався порівняно з контролем на $73,8 \%$ і становив $2,64 \pm 0,86$ клітин/ мм^2 тиреоїдної тканини. При цьому загальна кількість С-клітин у зразках тканини залишалась незмінною порівняно з контролем і складала $755,2$ клітин/ мм^2 площі центральної зони тиреоїдної паренхіми. Інші показники, обрані для характеристики С-клітин, також не мали достовірних змін і зберігали тенденції до зниження порівняно з контролем даної серії експерименту.

Через 24 години після закінчення опромінення зміна експресії ЯАКП клітинами щитовидної залози виявилась суттєвою, проте не достовірною (зниження на майже 40%), що склало $6,07 \pm 3,25$ клітин/ мм^2 . Дані зміни супроводжувались достовірним зниженням кількості С-клітин на 43% , загальна кількість яких у цілому досягла $422,5$ клітин/ мм^2 площі центральної зони тиреоїдної паренхіми. Площа та прозорість С-клітин у щитовидній залозі даної групи мали тенденцію до зниження й становили $78,1$ та $1,8 \text{ мкм}^2$ відповідно. На відміну від інших експериментальних груп, спостерігалось достовірне зменшення співвідношення максимального та мінімального розмірів С-клітин на майже 10% у даній дослідній групі.

Рівень експресії ЯАКП у тироцитах щитовидної залози тварин через п'ять діб після всього курсу опромінення суттєво і достовірно знижувався на 67% і складав близько $3,3 \pm 0,8$ клітин/ мм^2 площі. Кількість С-клітин на 1 мм^2 площі центральної

зони тиреоїдної паренхіми не відрізнялась від такої в контролі й становила 555,5 клітини. Проте зміни площі, співвідношення розмірів і прозорості С-клітин не носили достовірного характеру.

Через 7 діб після початку опромінення кількість клітин щитовидної залози суттєво достовірно знижувалась більше ніж на 69 % і складала $3,12 \pm 1,50$ клітин/мм². Подібно до дослідної групи 2–3 зменшення кількості С-клітин мало помірний, але недостовірний характер і становило близько 20 %, що відповідало 578 клітин/мм² площі центральної зони тиреоїдної паренхіми. Зміни співвідношення розмірів і прозорості С-клітин також не мали достовірного характеру та були подібні до контрольної групи. Площа С-клітин мала незначні тенденції до зменшення.

За сучасними уявленнями, ушкодження біологічно важливих структур клітини на фізико-хімічному рівні впливу радіації може бути реалізоване двома шляхами. У першому випадку електрони, що утворилися в процесі поглинання енергії, як правило, призводять до розриву молекулярних зв'язків тієї структури, що є мішенню. Завдяки цьому виникають одно- та дwonиткові розриви молекул ДНК, що з певною ймовірністю детермінують незворотні пошкодження у геномі клітини. Такі пошкодження лінійно залежать від щільності іонізації, дози опромінення та мають поріг дії, що визначається надійністю живої системи й, у першу чергу, станом репаративних систем [3; 11].

Радіаційні ураження щитовидної залози вивчались на тваринах різних видів із використанням різних доз опромінення. Так, наприклад, при опроміненні курчат рентгенівськими променями у дозі 0,25 Гр спостерігалось підвищення у крові T_3 , зниження T_4 . При цьому морфологічні дані вказували на гіпертрофію та гіперплазію фолікулярного епітелію, які були наслідком секреторної активності та росту тироцитів. Пригнічення виходу T_4 у кров зумовлене неспроможністю протеолітичного розщеплення йодованого тиреоглобуліну в лізосомах тироцитів.

Таким чином, щитовидна залоза під впливом зовнішнього опромінення зазнає деструктивних змін на клітинному рівні, що призводить до порушення її функцій.

Матеріалом досліджень після вибуху на ЧАЕС були раніше також жуйні тварини з Хойнікського та Брагінського районів Гомельської області в 1986–1988 рр. [14]. У цих дослідженнях встановлено, що початкові зміни щитовидної залози тварин проявлялись при поглинутих дозах 10–20 Гр збільшенням функціональної активності органа. Після формування в щитовидній залозі доз понад 100 Гр реєстрували пригнічення тиреоїдної функції та некробіотичні зміни щитовидної залози через 20–30 діб від початку радіаційного впливу. Недостатність функцій щитовидної залози супроводжувалась спочатку короточасним лейкоцитозом із наступними лейко- та тромбоцитопенією, зниженням функціональної активності Т- і В-лімфоцитів, фагоцитарної здатності нейтрофілів. На фоні зниження концентрації тироксину підвищувались титри аутоантитіл до тканин щитовидної залози в сироватці крові.

Аналіз отриманих даних свідчить про те, що прояви радіаційного ураження організму після аварії на ЧАЕС виражалися однаково у тварин різних видів і були пов'язані з періодом формування і величиною поглинутих щитовидною залозою доз опромінення. При цьому розвивалася хронічна хвороба легкого (10–20 Гр), середнього (20–100 Гр) та тяжкого (100–3000 Гр) ступеня.

До Чорнобильської катастрофи рак щитовидної залози у дітей і підлітків на території України, Білорусії та Росії зустрічався дуже рідко. У Білорусії, наприклад, за 1965–1985 рр. був зареєстрований тільки 21 випадок. До 1996 року захворюваність раком щитовидної залози у дітей і підлітків Росії та України на забруднених радіацією територіях збільшилась у десятки разів, а в Білорусії – країні, що найбіль-

ше постраждала від чорнобильського викиду, – у сотні разів. У Білорусії відомі випадки народження дітей із цим захворюванням щитовидної залози.

На початок 1996 р. на території СНД, забрудненій чорнобильським вибухом, нараховувалось близько 1000 пацієнтів, хворих на рак щитовидної залози. За сучасними прогнозами, в найближчі роки треба очікувати ще не менше 3000 хворих, причому ріст числа хворих може збільшуватись до 2006–2011 рр.

Рак щитовидної залози, спричинений чорнобильським опроміненням, виявився незвичайно агресивним, з раннім і швидким утворенням метастазів у лімфатичних вузлах і легенях [4].

Необхідно зазначити, що одночасно спостерігається колосальний сплеск інших патологій щитовидної залози: захворювання ендемічним зобом по Гомельській області збільшилося з 1985 по 1993 р. у 7 разів, а аутоімунним тиреоїдитом з 1988 по 1993 р. – більше ніж у 600 разів.

У 1993 р. понад 40 % обстежених дітей Гомельської області мали збільшену щитовидну залозу. Із 3437 обстежених дітей м. Мозиря та Мозирського району збільшена залоза виявлена у 47 %.

Заключення

Отримані результати нашої роботи вказують на певний характер змін у щитовидній залозі щурів у відповідь на фракціоноване опромінення навіть низької інтенсивності. Виражених морфологічних змін у щитовидній залозі контрольних і піддослідних щурів не отримано, але, спираючись на результати імуногістохімічного дослідження, можна виразити думку, що загальна доза опромінення 0,25 Гр при хронічному впливі іонізуючої радіації на весь організм призводить до зниження ЯАКП-позитивних клітин порівняно з контрольними групами, що може пояснюватись порушенням клітинного циклу. Тобто така доза іонізуючого опромінення спочатку затримує проліферацію тироцитів – клітини із G_1 періоду не переходять у S -період, тобто у ядрі не відбувається реплікація ДНК. Такі зміни з часом мають тенденцію до вирівнювання, але рівень залишається низьким порівняно з контрольною групою. Порушення мітотичного циклу клітини, яке виникає під впливом іонізуючого опромінення, веде до змін нормальних життєвих процесів у клітині, що може в подальшому відбитися на її функціональній активності. Внаслідок цього існує вірогідність розвитку різноманітних патологій, які беруть свій початок із порушень на молекулярному рівні, тобто на рівні ДНК. Подібного роду порушення [5] можуть призводити до ініціації новоутворень, що узгоджується з літературними даними.

Бібліографічні посилання

1. **Баянов В. А.** Йод / В. А. Баянов, И. А. Василенко // Вредные химические вещества. Радиоактивные изотопы. – Л., Химия, 1990. – С. 335–343.
2. **Влияние низких доз** ионизирующей радиации и других факторов окружающей среды на организм / Под ред. М. И. Руднева. – К.: Наукова думка, 1994. – С. 7–12.
3. **Гераськин С. А.** Критический анализ современных концепций и подходов к оценке биологического действия малых доз ионизирующего излучения // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т. 35, № 5. – С. 563–571.
4. **Гофман Д.** Рак, вызываемый облучением в малых дозах. Независимый анализ проблемы. – М., 1994. – С. 1–8.
5. **Кудряшов Ю. Б.** Основные принципы в радиобиологии // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2001. – Т. 41, № 5. – С. 531–547.

6. **Новые аспекты закономерностей действия низкоинтенсивного облучения в малых дозах** / Е. Б. Бурлакова, А. Н. Голощапов, Г. П. Жижина, А. А. Кондратов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, № 1. – С. 26–34.
7. **Doniach I.** Biological effects of ^{131}I and ^{125}I isotopes of iodine in rat / I. Doniach, D. J. Shale // J. Endocrinol. – 1976. – Vol. 71. – P. 109–114.
8. **Immunocytochemical methods and protocols** / Ed. L. C. Javois. – Humana Press, 1999. – 233 p.
9. **Malone J. F.** The radiation biology of the thyroid // Current topics in radiation research quarterly. – 1975. – Vol. 10, N 4. – P. 263–368.
10. **Mize R. R.** Quantitative image analysis for immunocytochemistry and in situ hybridization // Neuroscience methods J. – 1994. – Vol. 54. – P. 219–237.
11. **Radford I. R.** The level of induced DNA double-strand breakage correlates with cell killing after x-irradiation // Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. – 1985. – Vol. 48. – P. 45–54.
12. **Some morphological changes** in the thyroid gland during experimental hyperphenylalaninemia / V. Usenko, I. Kornilovska, V. Lizogubov et al. // Anatomical Rec. – 1997. – Vol. 248. – P. 251–258.
13. **The influence** of low doses ^{131}I -induced maternal hypothyroidism on the development of rat embryos / V. Usenko, E. Lepekhin, V. Lizogubov et al. // Exp. Toxic Pathol. – 1999. – Vol. 51. – P. 223–227.
14. **Thyroid pathology** in residents of the Kiev region, Ukraine, during pre- and post-Chernobyl periods / I. L. Avetisyan, N. V. Gulchik, A. P. Demidjuk, A. V. Stashuk // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. – 1996. – Vol. 15, N 2–4. – P. 233–237.

Надійшла до редколегії 01.11.05.

УДК 612.82:615.214.24

Т. Г. Чаус, В. П. Ляшенко, С. М. Лукашов, Г. Г. Чаус

Дніпропетровський національний університет

ДІЯ АМІТРИПТИЛІНУ НА БІОЕЛЕКТРИЧНУ АКТИВНІСТЬ ГІПОКАМПУ НА ФОНІ РОЗВИТКУ ДОВГОТРИВАЛОГО СТРЕСУ

Проаналізовано динаміку змін потужностей біоелектричної активності гіпокампу у тварин контрольної групи та за умов іммобілізаційного стресу паралельно зі щурами, які на фоні розвитку стрес-реакції приймали амітриптилін. Динаміка змін біоелектричної активності гіпокампу відображає особливості перебудови пристосувальних механізмів мозку при стійкій зміні режиму його функціонування за умов розвитку довготривалого стресу.

Dynamics of changes of capacities of hippocampus bioelectric activity in control rats, in animals under immobilization stress and in the long-term stressed rats, which was administrated by amitriptyline, was analyzed. The dynamics of changes of the hippocampus bioelectric activity reflects features of reorganization of the brain adaptive mechanisms with the constant change of its functioning mode under conditions of the long-term stress development.

Вступ

Живий організм намагається підтримувати оптимальні умови свого життя. Коли умови навколишнього середовища змінюються, індивідууми пристосовуються до цього шляхом адаптивної чи гомеостатичної відповіді, яка спрямована на захист внутрішнього середовища від небезпечних змін [3; 7]. Якщо організму висувають надмірні вимоги або погрози, адаптивна відповідь починає набувати неспецифічного

© Чаус Т. Г., Ляшенко В. П., Лукашов С. М., Чаус Г. Г., 2005