

Ю. П. Гриневич<sup>1</sup>, І. П. Дрозд<sup>1</sup>, А. І. Липська<sup>1</sup>, С. В. Телецька<sup>1</sup>, Л. І. Маковецька<sup>2</sup><sup>1</sup> Інститут ядерних досліджень НАН України, Київ<sup>2</sup> Інститут експериментальної онкології, патології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

### ПЕРОКСИДАЗНА АКТИВНІСТЬ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ТРИВАЛОГО НАДХОДЖЕННЯ <sup>137</sup>Cs

Методом хемілюмінесценції досліджено пероксидазну активність крові білих нелінійних щурів-самців за щоденного перорального надходження 15 кБк <sup>137</sup>Cs. Виявлено коливальний характер змін показників пероксидазного окиснення крові, максимальні відхилення яких від контролю реєструються на 4 та 60 добу, а мінімальні на 1, 7 та 135. Відновлення кінетичних параметрів хемілюмінесценції не відбувається впродовж 135 діб спостереження (90-та доба від завершення введення радіоактивного цезію).

*Ключові слова:* хемілюмінесценція, перекисне окиснення ліпідів, пероксидазна активність крові, внутрішнє опромінення, малі дози.

Чутливість організму до іонізуючого випромінювання (ІВ) у широкому діапазоні доз пов'язана з його антиоксидантним статусом [1]. За дії ушкоджуючих факторів, зокрема і ІВ, в організмі активуються процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що є важливою ланкою регуляції клітинного метаболізму. За нормального функціонування тканинам властивий досить низький рівень ПОЛ (фізіологічна норма), що підтримується за рахунок збалансованого процесу утворення та елімінації вільних радикалів [2]. Однак за дії різних екзогенних чинників такий баланс може порушуватися, унаслідок чого в тканинах накопичуються перекиси, які призводять до зміни структури та функції біологічних мембран [3, 4], що може спричинити виникнення низки захворювань, зокрема й онкологічних [5, 6].

Унаслідок Чорнобильської катастрофи в оточуюче середовище потрапила велика кількість техногенних радіонуклідів, що призвело до радіоактивного забруднення значних територій України, Білорусі, Росії. Населення цих територій і дотепер зазнає хронічного впливу ІВ у малих дозах. На даний час основними дозоутворюючими радіонуклідами є <sup>137</sup>Cs і <sup>90</sup>Sr. Тому за даних умов вивчення стану системи ПОЛ – антиоксидантного захисту (АОЗ) – є і нині актуальним завданням. Хоча цьому питанню приділялася і приділяється значна увага, відомості про хронічний вплив малих доз радіації на окремі ланки ПОЛ як у системі крові, так і в окремих тканинах у літературі представлені досить фрагментарно. Особливий інтерес представляє дослідження процесів ПОЛ за внутрішнього надходження радіонуклідів, оскільки за даними [7, 8] у цьому випадку хронічне опромінення навіть у дозах, що не набагато перевищують природний радіаційний фон, може призвести до значних

фізіологічних змін у тканинах і органах зі специфічним стимулюванням ПОЛ. Власне не сама активація вільнорадикального окиснення, а порушення балансу між рівнем активних форм кисню та рівнем АОЗ розглядається як одна із основних причин радіаційного ушкодження клітин і тканин на молекулярному рівні.

Поза сумнівом, істотна роль у виникненні та розвитку патологічних станів належить саме системі крові, яка забезпечує транспорт води, газів, метаболітів (субстратів і продуктів) між клітинами та тканинами організму.

Оцінити динаміку прооксидантно-оксидантної рівноваги, резерви системи АОЗ та прогнозувати не лише функціональні можливості організму, але й процеси його відновлення за окисним гомеостазом за дії іонізуючої радіації дозволяє метод хемілюмінесценції (ХЛ) [9, 10].

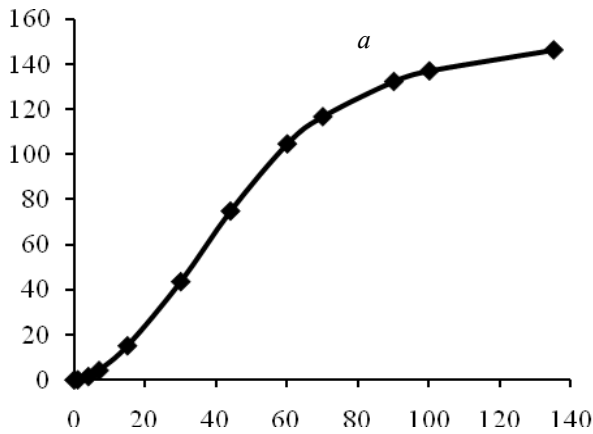
Захист організму від накопичення в клітинах органічних перекисів та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> здійснюється пероксидазами – залізо-порфіриновими ферментами (гемопротейди). Їхнє біологічне значення визначається участю в окисненні різноманітних субстратів на мембранах мітохондрій і мікросом, а також у тканинах. У присутності H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> пероксидази каталізують окиснення фенолів, аміаку, адреналіну, гістаміну, жирних кислот, нуклеотидів, йодиду [11].

Для визначення ранніх та віддалених дозозалежних змін у крові щурів за тривалого надходження до організму <sup>137</sup>Cs було досліджено її пероксидазну активність у динаміці розвитку променевих уражень за показниками ХЛ.

#### Матеріали та методи

Дослідження виконано на статевозрілих безпородних білих щурах-самцях масою 180 - 220 г, які перебували на стандартному утриманні та

харчовому раціоні. За моделювання хронічного експерименту 0,2 мл водного розчину цезію хлориду активністю 15 кБк ( $^{137}\text{Cs}$ ) вводили впродовж 45 діб в один і той же час уранці (з 10 до 12 год) перорально через зонд кожній тварині. Відбір крові із хвостової вени (по 0,1 мл) проводили впродовж 135 діб на 1, 4, 7, 15, 30, 45, 60, 70, 90, 100 та 135 добу від початку введення ізотопу. Тварин забивали в ті ж терміни експерименту з дотриманням вимог ст. 26 Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження”. На кожну точку забою використовували по п’ять тварин. Вміст  $^{137}\text{Cs}$  в організмі та крові вимірювали  $\gamma$ -спектрометричним методом з використанням Ge(Li) детектора ДГДК-60. Динаміку формування поглиненої дози та її потужності визначали впродовж 135 діб від початку експерименту. Дози опромінення щурів визначали за багатокамерною моделлю [12].



Пероксидазну активність периферичної крові досліджували на хемілюмінометрі ХЛМ1Ц-01 за методом Toledo [10]. Його чутливість у визначенні пероксидазної активності крові (за концентрацією пероксидази із хрину) становить від  $10^{-11}$  М і вище, тоді як спектрофотометричного –  $10^{-9}$  М.

Визначали світлосуму свічення за 5 хв ( $\Sigma_{300}$ ), його максимальну ( $I_{\text{max}}$ ) та прикінцеву інтенсивність ( $I_{\text{к}}$ ). Як правило, за нормального фізіологічного стану тварин реакція пероксидазного окиснення крові повністю завершується за 5 хв.

Статистичну обробку результатів виконували стандартними методами з використанням прикладного програмного пакета MS Excel 2007.

### Результати та обговорення

Динаміку формування поглиненої дози в організмі щурів та її потужності відображено на рис. 1.

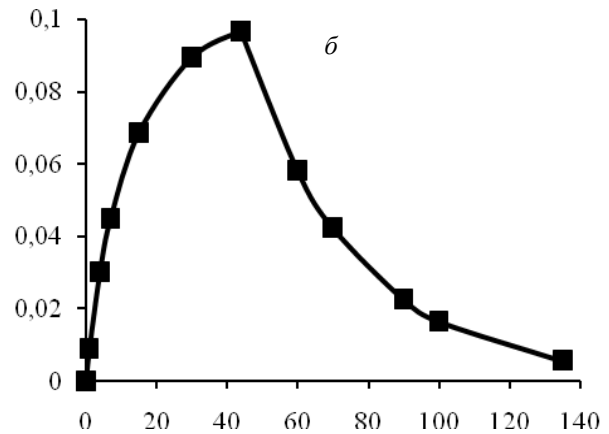


Рис. 1. Динаміка формування поглиненої дози в організмі щурів (а) та її потужності (б) за щоденного надходження 15 кБк  $^{137}\text{Cs}$  впродовж 45 діб. По осі ординат поглинена доза, мГр (а) та потужність дози, мГр/год (б); по осі абсцисс термін від початку надходження ізотопу, доби.

Згідно з рис. 1, а на 14-ту та 60-ту доби від початку надходження  $^{137}\text{Cs}$  спостерігали зміни градієнта його накопичення. Величина потужності дози поступово зростала й досягала свого максимуму на 45-ту добу (завершення введення ізотопу), після чого спостерігали її експоненціальний спад (див. рис. 1, б). На рис. 2 представлено динаміку питомої активності (концентрації)  $^{137}\text{Cs}$  в крові, що поступово зростає і досягає максимального значення на 45-ту добу, з наступним експоненціальним зниженням до нульових значень на 135-ту добу експерименту.

Дослідження активності пероксидази в периферичній крові в групі контрольних тварин не виявили суттєвих змін як  $\Sigma_{300}$ , так і  $I_{\text{max}}$  впродовж експерименту. Так, якщо на початку експерименту їхні значення становили для  $\Sigma_{300}$   $215 \cdot 10^3 \pm 19 \cdot 10^3$  імп, а для  $I_{\text{max}}$   $1100 \pm 98$  імп/с, то на 135-ту добу вони були відповідно  $210 \cdot 10^3 \pm 18 \cdot 10^3$  імп і  $950 \pm 89$  імп/с.

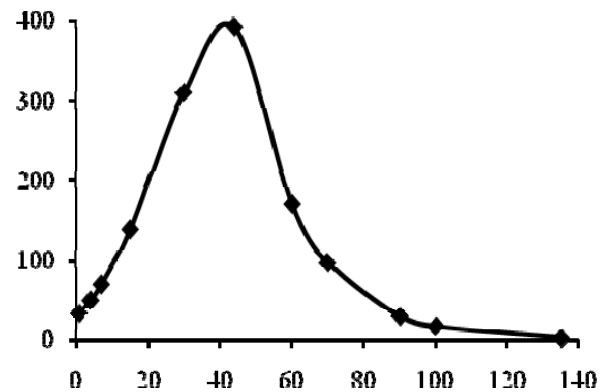


Рис. 2. Динаміка концентрації  $^{137}\text{Cs}$  в крові щурів. По осі ординат питома активність ізотопу, Бк/г; по осі абсцисс термін від початку надходження ізотопу, доби.

За вихідні дані в експериментальній групі тварин були взяті усереднені показники ХЛ крові щурів, яким надалі вводили  $^{137}\text{Cs}$ . У тварин цієї групи виявлено односпрямованість змін основ-

них ХЛ-характеристик крові на всіх етапах спостережень. Їхня динамічна крива містить декілька екстремумів з досягненням мінімальних значень

(за показниками  $\sum_{300}$  і  $I_{\max}$ ) на 1, 7, 44, 100 і 135 доби, а максимальних на 4 та 60 доби. (рис. 3, а і б).

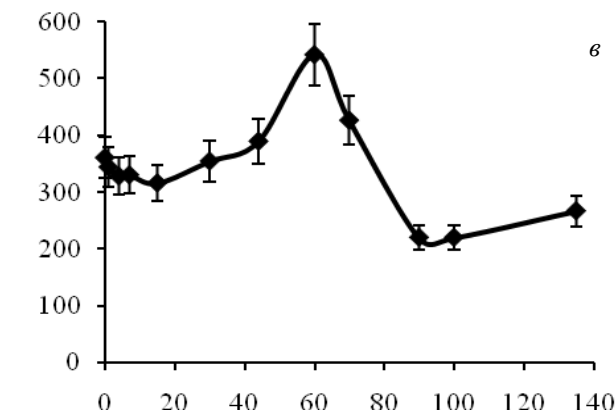
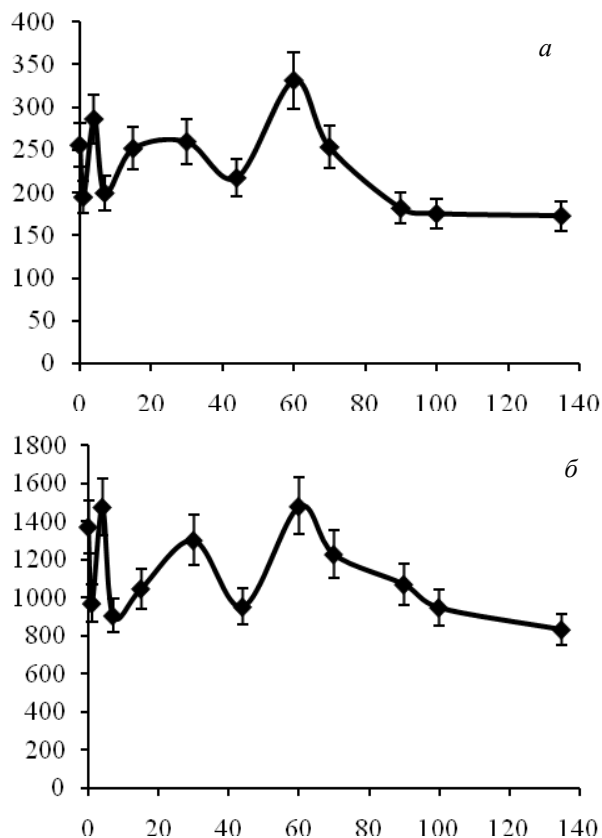


Рис. 3. Параметри ХЛ крові щурів за тривалого надходження  $^{137}\text{Cs}$  до організму. По осі ординат: а – світлосума свічення,  $10^3 \text{ імп} \cdot 5 \text{ хв}$ ; б – максимальна інтенсивність свічення, імп/с; в – прикінцева інтенсивність свічення, імп/с. По осі абсцис (а, б, в) термін від початку опромінення, доби.

За даними літератури [13], на першу добу йде мобілізація захисних сил організму, що проявляється в активації антиоксидантної системи. Згідно з нашими даними в ланці пероксидазного захисту такої активації не відбувається. Починаючи з четвертої доби, спостерігали коливальні зміни пероксидазної активності крові. Це вказує на складний багатофакторний механізм розвитку перекисних процесів і їхньої регуляції за тривалого радіаційного навантаження. Однонаправленість змін  $\sum_{300}$  і  $I_{\max}$  свідчить про те, що між кількістю ферменту та його функціональною активністю дискоординації не відбувається.

Водночас підвищення рівня вільнорадикальних продуктів у крові може бути, переважно, наслідком інтенсифікації процесів їхнього генерування в тканинах, оскільки вміст активних метаболітів кисню, що ініціюють процеси ПОЛ у біологічних рідинах, зокрема і крові, регулюються специфічними й неспецифічними компонентами антиоксидантної системи [14].

Інтенсивність прикінцевого свічення (див. рис. 3, в) експоненціально зростала й досягла максимуму на 60-ту добу експерименту, що приблизно в 1,5 рази перевищує контрольні значення. Надалі  $I_k$  змінювалась симбатно з  $\sum_{300}$  і  $I_{\max}$ . Очевидно, у цей період функціональна активність пероксидази крові зменшується, у резуль-

таті чого не відбувається повноцінного знешкодження нею  $\text{H}_2\text{O}_2$ , органічних перекисів та інших токсичних ендогенних продуктів ПОЛ. За таких умов активний центр ферменту може блокуватися продуктами ушкодження клітинних структур (початковими ендогенними радіотоксинами), джерелом яких за рівномірного та нерівномірного опромінення стає вся сукупність опромінених тканин. Усі ці процеси призводять до формування радіобіологічних ефектів, що знаходяться у прямій залежності від кількості поглиненої опроміненими тканинами енергії [15]. За таких умов каталіз може відбуватися й на боковій (білковій) частині молекули [11].

Упродовж 135 дб експерименту не спостерігалось відновлення кінетичних параметрів ХЛ до контрольних значень. На даний термін значно зменшилась як активність ферменту, так і його кількість, що може призводити до зміни каталізу дисмутації активних форм кисню й інтенсифікації вільнорадикального окиснення, що збільшує ймовірність малігнізації тканин, зміни окисного метаболізму, зниження компенсаторно-захисних можливостей організму. Слід зазначити, що фактор часу за умови постійного впливу малих доз радіації є визначальним у реалізації біологічних ефектів [16].

Лінійної залежності показників ХЛ від поглиненої дози ми не спостерігали. Однак, з накопиченням поглиненої дози до 60-ї доби, незважаючи на коливальний характер, показники  $\Sigma_{300}$  і  $I_{\max}$  демонстрували тенденцію до зростання. У точках зміни градієнта потужності дози (14-та та 60-та доби) спостерігали мінімум і максимум показників  $\Sigma_{300}$  і  $I_{\max}$  відповідно. Починаючи з 60-ї доби, і до кінця спостережень усі показники ХЛ експоненціально знижувались, що корелює зі зменшенням величини потужності дози. Тільки для показника  $I_r$  спостерігали тенденцію відновлення до вихідних значень.

При максимальній концентрації  $^{137}\text{Cs}$  в крові (44-та доба експерименту) реєстрували мінімальні значення пероксидазної активності крові (див. рис. 3, а і б). Слід зазначити, що підвищення її показників до максимальних значень на 60-ту добу збігається із значним зменшенням питомого вмісту  $^{137}\text{Cs}$  (з 392 до 179 кБк/г) у крові.

Відомо, що активні продукти, що утворились унаслідок опромінення організму, не лише ініціюють, а й прискорюють вільнорадикальні реакції ПОЛ. З часом антиоксидантні резерви за інактивації активних продуктів вичерпуються й останні накопичуються в організмі. Підтвердженням цього є коливальні зміни показників ХЛ крові, що відображають як процеси активації, так і виснаження захисних сил організму, спрямовані на

вирівнювання та стабілізацію окисно-відновного гомеостазу у ферментативній його ланці [17]. Наслідком виснаження антиоксидантних резервів може бути посилення патологічних процесів, викликаних безпосередньо радіаційним фактором. Тобто за дії іонізуючого випромінювання ендогенним “гарантом” захисту від радіаційного ушкодження є саме висока функціональна активність ферментативної антиоксидантної системи крові. За таких умов додатковими компенсаторними нормалізуючими чинниками можуть бути екзогенні антиоксиданти та засоби, що прискорюють виведення радіонуклідів з організму [18].

Представлені дані свідчать про складну залежність “доза опромінення – ефект” у системі окисного гомеостазу тварин при тривалому надходженні радіонуклідів  $^{137}\text{Cs}$  (15 кБк) до організму. Це може бути обумовлено тим, що радіаційно-індуковані ефекти в організмі впродовж експерименту формуються за суттєвих змін величини потужності дози. Вони також можуть бути наслідком тонких порушень механізмів адаптації (деадаптації) організму за тривалої дії радіації на рівні прихованих і упорядкованих у певній послідовності окиснювально-відновних процесів, які виявляються в біологічних ритмах – найважливіших механізмах регуляції функцій організму, що забезпечують гомеостаз, динаміку, рівновагу і процеси адаптації в біологічних системах [19].

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шевченко О.Г. Роль исходных показателей антиоксидантного статуса в формировании биологических последствий низкоинтенсивного облучения в малой дозе // Биол. эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды: Материалы Междунар. конф. - Сыктывкар, 2001. - С. 251.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 252 с.
3. Бяков В.М., Степанов С.В. О механизме первичного радиобиологического действия // Радиационная биология. Радиозология. - 1997. - Т. 37, вып. 4. - С. 469 - 474.
4. Кузин А.М. Основные принципы структурно-метаболической теории в радиобиологии // Радиобиология. - 1976. - Т. 16, № 2. - С. 163 - 170.
5. Липська А.І., Серкіз Я.І. Природа та закономірності радіаційного канцерогенезу // Зб. наук. праць Ін-ту ядерних дослід. - 2004. - № 2 (13). - С. 114 - 121.
6. Зенков Н.К., Ланкин В. В., Меньшикова С.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. - М.: Маик “Наука. Интерпримодика”, 2001. - 343 с.
7. Ильин Б.Н., Борисова В.В., Ветух В.А. Отдаленные биологические эффекты комбинированного действия радионуклидов различной тропности. - М.: Энергоатомиздат, 1991. - 160 с.
8. Чаляло П.П., Чоботько Г.М., Гришко Г.М. Метаболічні наслідки аварії на Чорнобильській АЕС. - К.: ДП “Чорнобильінтерінформ”, 2001. - 152 с.
9. Серкіз Я.І., Дружина Н.А., Хриенко А.П. и др. Хемилюминесценция крови при радиационном воздействии. - К.: Наук. думка, 1989. - 176 с.
10. De Toledo S.A.M., Haun M.H.A., Bechara E.Y.H., Duran N. Peroxidase and Hydrogen peroxidase detection by a bicenergizet Method // Anal. Biochemistry. - 1980. - Vol. 105-1. - P. 162 - 170.
11. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Успехи совр. естествознания. - 2006. - № 7. - С. 29 - 36.
12. Липська А.І., Дрозд І.П. Особливості дозоутворення та методи розрахунку доз при внутрішньому надходженні  $^{137}\text{Cs}$  до організму лабораторних щурів // Ядерна фізика та енергетика. - 2008. - № 1(23). - С. 78 - 87.
13. Барабой В.А., Олійник С.А., Хмельський Ю.В. Стан антиоксидантної системи за дії іонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності // Укр. біохім. журн. - 1994. - Т. 64, № 4. - С. 3 - 17.

14. Дубина Е.Е. Антиоксидантная система плазмы крови // Там же. - 1992. - Т. 64, № 2. - С. 3 - 15.
15. Серкиз Я.И., Пинчук В.Г., Пинчук Л.Б. и др. Радиобиологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС. - К.: Наук. думка, 1992. - 172 с.
16. Маковецька Л.І. Особливості формування радіаційних ефектів в системі крові тварин за дії малих доз радіації внутрішнього опромінення: Автореф. дис. ... канд. біол. наук // ІЕПОР. - К., 2011. - 20 с.
17. Данко І.М., Данко М.Й. Інтенсивність процесів перекисного окиснення та активність ферментів антиоксидантної системи крові тварин, що зазнали тривалого впливу низьких доз радіації // Доп. НАН України. - 1999. - № 8. - С. 149 - 152.
18. Дружина Н.А., Родионова Н.К., Рябченко Н.Н. и др. Модификация эффектов малых доз радиации у животных с различной радиочувствительностью // VI съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозэкология, радиационная безопасность), 25 - 28 октября 2010 г.: Тез. докл. - М., 2010. - С. 185.
19. Биологические ритмы: В 2 т.; Пер. с англ. / Под ред. Ю. Ашоффа. - М.: Мир, 1984. - Т. 1. - 414 с.; - Т. 2. - 262 с.

**Ю. П. Гриневич, И. П. Дрозд, А. И. Липская, С. В. Телецкая, Л. И. Маковецкая**

#### **ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КРОВИ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ <sup>137</sup>Cs**

Методом хемилюминесценции исследована пероксидазная активность крови белых нелинейных крыс-самцов при ежедневном пероральном поступлении 15 кБк <sup>137</sup>Cs. Выявлен колебательный характер изменений хемилюминесцентных показателей пероксидазного окисления крови, максимальные отклонения которых от контроля регистрируются на 4 и 60 сутки, а минимальные на 1, 7 и 135. Восстановление кинетических параметров хемилюминесценции не происходит в течение 135 сут наблюдения (90-е сутки от завершения введения радиоактивного цезия).

*Ключевые слова:* хемилюминесценция, перекисное окисление липидов, пероксидазная активность крови, внутреннее облучение, малые дозы.

**Yu. P. Grynevych, I. P. Drozd, A. I. Lypska, S. V. Teletska, L. I. Makovetska**

#### **PEROXIDASE ACTIVITY OF THE RAT BLOOD AT PROLONGED INTAKE OF <sup>137</sup>Cs**

Investigated peroxidase activity of blood white nonlinear rats-males by daily oral administration of 15 kBq <sup>137</sup>Cs by chemiluminescence. Discovered oscillatory nature of the changes chemiluminescent indicators peroxidase oxidation of blood, the maximum deviation of the control are registered during the 4<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> days, and the minimum at the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup> and 135<sup>th</sup> days. Recovering kinetic parameters CL does not occur within 135 days of observation (the 90<sup>th</sup> day of the completion of the introduction of radioactive cesium).

*Keywords:* chemiluminescence, lipid peroxidation, peroxidase activity of blood, internal exposure, low-level doses.

Надійшла 30.10.2012

Received 30.10.2012