

Л.А. Ляшенко
Л.В. Дробинская
Л.А. Дарчук
Н.А. Паладич

Научный центр радиационной
медицины АМН Украины,
Киев, Украина

Ключевые слова:

ионизирующее излучение,
перекисное окисление липидов,
антиоксидантная система,
ДНК, РНК, инфракрасная
спектроскопия.

О ЗНАЧЕНИИ НЕКОТОРЫХ МАРКЕРОВ РАДИАЦИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ГРУПП ПОВЫШЕННОГО РИСКА РАЗВИТИЯ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Резюме. На протяжении 1987–1997 гг. обследовано 305 мужчин в возрасте 35–45 лет (участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС с дозой внешнего облучения 0,25–0,75 Гр; лиц, перенесших ОЛБ I и II степени; работников ЧАЭС). Контрольную группу составили практически здоровые лица — доноры Киевской городской станции переливания крови. Проводили оценку состояния антиоксидантной системы по активности основных сопряженных ферментов — супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах крови, перекисного окисления липидов по содержанию в сыворотке крови малонового диальдегида, исследовали молекулярные спектры проб суточной мочи, а также содержание ДНК и активность ДНКаз суточной мочи. Выявлено существенное нарушение липоперекисного гомеостаза, которое усугубляется недостаточной эффективностью функционирования антиоксидантной системы у обследованных всех групп, подвергшихся влиянию различных доз ионизирующего излучения. Повышение концентрации ДНК в моче у обследованных, подвергшихся влиянию разных доз ионизирующего излучения, происходит на фоне повышения общей и свободной активности ДНКаз. Общими для всех инфракрасных спектров образцов сухого остатка суточной мочи пациентов, подвергавшихся воздействию внешнего радиоактивного излучения, являются качественные изменения в спектральном интервале, в котором находятся полосы поглощения, присутствующие фосфатным анионам кристаллического компонента костной ткани. В этих спектрах также присутствуют полосы поглощения, характерные для пирофосфатных соединений $Ca_3H_2(P_2O_7)_2 \cdot 4H_2O$.

ВВЕДЕНИЕ

Влияние ионизирующей радиации на организм обуславливает развитие сложных физико-химических, биохимических нарушений и функциональных изменений в органах и тканях организма. Эти изменения способствуют развитию у человека острых и отдаленных патологических последствий стохастической и нестохастической природы [1].

В патогенезе различных заболеваний существенную роль играет активация свободнорадикального окисления энергетических субстратов клетки, что приводит к повреждению структуры, а следовательно, к нарушению функционирования биологических мембран [2]. Степень повреждений зависит от состояния антиоксидантной системы (АОС) организма, которая регулирует уровень активных метаболитов кислорода [3].

Ионизирующее излучение инициирует процессы липопероксидации, вследствие чего снижается уровень антиоксидантной защиты клеток, а это в свою очередь приводит к повышению ионной проницаемости клеточных мембран, их повреждению. Следствием таких процессов являются биохимические, физиологические и морфологические изменения в органах [3]. Интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) приводит к нарушению метаболизма белков, липидов и нуклеиновых кислот [4].

Важное значение в поломке генома имеет прямое и опосредованное воздействие ионизирующего излучения на молекулы ДНК и ферментные системы, обеспечивающие деградацию и репарацию ДНК [5, 6]. Динамика изменений показателей ДНК и ДНКаз в отдаленный послеаварийный период по-

звolyет формировать из числа пострадавших группу повышенного риска по развитию онкогематологических заболеваний. Ионизирующее излучение играет определенную роль в нарушении динамического равновесия между элементами костной и кровяной ткани на различных этапах лейкогенеза. Особое место отводится структурным изменениям коллагена и неорганической составляющей гидроксиапатита кости при развитии лейкоза и сопутствующего оссалгического синдрома у участников ликвидации последствий аварии (ЛПА) на ЧАЭС [7, 8].

Авария на ЧАЭС поставила перед практическим здравоохранением, радиационной медициной проблему оценки и прогнозирования здоровья людей, в частности проблему ранней диагностики радиоиндуцированных онкогематологических заболеваний. Для этого необходима разработка новых критериев оценки медико-биологических последствий и прогнозирования отдаленных стохастических эффектов ионизирующего излучения в широком диапазоне доз.

Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе мы попытались представить данные по изучению состояния липоперекисного гомеостаза, ферментативной АОС, нуклеинового обмена и минерального компонента остеона у лиц, подвергшихся влиянию ионизирующего излучения в широком диапазоне доз. Целью исследования был отбор маркеров радиационного повреждения для формирования групп повышенного онкогематологического риска.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 305 мужчин — ЛПА на ЧАЭС в возрасте 35–45 лет. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц — доноры Киевской городской станции переливания крови (1-я группа). Участники ЛПА, перенесшие ОЛБ II степени (65 человек), составили 2-ю группу. В 3-ю группу вошли участники ЛПА, перенесшие ОЛБ I степени (70 человек), в 4-ю группу — участники ЛПА, получившие дозу внешнего облучения 0,25–0,75 Гр (80 человек), в 5-ю группу — сотрудники ЧАЭС (работающие на станции с 1990 г. и по настоящее время), получившие дозу внешнего облучения 0,05–0,2 Гр (60 человек).

Содержание конечных продуктов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) — определяли в сыворотке крови по его реакции с тиобарбитуровой кислотой [9]; состояние системы антиоксидантной защиты оценивали по активности основных сопряженных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД) [10] и каталазы [11] в эритроцитах; функциональное состояние антиоксидантной системы защиты организма рассчитывали по фактору антиоксидантной системы [12].

Уровень ДНК, общую, свободную и связанную активность ДНКаз определяли в суточной моче с помощью спектрофотометрического метода по

скорости нарастания в реакционной смеси продуктов расщепления ДНК под действием ДНКазы и ослаблении этого процесса при внесении ингибиторов в реакционную смесь.

Исследование молекулярных спектров проб мочи проводили в области 700–2000 см⁻¹ [13–15]. Измерения молекулярных спектров сухого остатка суточной мочи выполняли в инфракрасном диапазоне с использованием автоматизированной установки на основе инфракрасного спектрометра ИКС-31. Математическая обработка результатов включала статистическую оценку показателей с использованием пакета прикладных программ STATISTICA for Windows, 4,5 на компьютере INTEL с процессором Pentium-100.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя результаты исследований состояния процессов ПОЛ и ферментативной АОС крови, мы установили существенное нарушение липоперекисного гомеостаза, которое усугубляется недостаточной эффективностью функционирования АОС у обследованных всех групп, подвергшихся влиянию ионизирующего излучения в широком диапазоне доз (таблица). Выявлено достоверное повышение концентрации токсического продукта липоперекисации — МДА в крови участников ЛПА (доза внешнего облучения 0,25–0,75 Гр; 4-я группа) и у лиц, которые с 1990 г. и по настоящее время работают на ЧАЭС (доза внешнего облучения 0,05–0,2 Гр; 5-я группа) по сравнению с контрольной группой. У лиц, перенесших ОЛБ II степени (2-я группа) и ОЛБ I степени (3-я группа), изменений в содержании МДА не установлено, что может быть обусловлено активацией нескольких путей утилизации этого метаболита, хотя при этом накапливались первичные и вторичные продукты ПОЛ — диеновые конъюгаты, кетодиены, триены, гидроперекиси, которые являются реакционноспособными и участвуют в повреждении мембран клеток.

Известно, что накопление продуктов ПОЛ вызывает подавление активности СОД и каталазы — основных ферментов антиоксидантной защиты, функция которых заключается в детоксикации основных реакционных продуктов ПОЛ, супероксиданиона и перекиси водорода. Установленное нами достоверное снижение активности СОД и каталазы у обследованных всех групп, подвергшихся влиянию ионизирующего излучения в широком диапазоне доз, является неблагоприятным прогностическим фактором, отражающим снижение защитных возможностей функционирования АОС, что приводит к неполному обезвреживанию и накоплению реакционноспособного продукта супероксиддисмутазной реакции — перекиси водорода и вносит свой вклад в нарушение ионной проницаемости мембран, структурной и функциональной их организации, а также нарушению биосинтеза белка. Нарушение

функциональных возможностей АОС подтверждено нами при расчете интегрального показателя АОС — фактора антиоксидантного состояния. Снижение величины интегрального показателя АОС установлено у обследованных всех групп, подвергшихся влиянию разных доз ионизирующего излучения. Выявленное нами уменьшение резервных возможностей АОС является тем общим патогенетическим звеном, при воздействии на которое взаимно усиливаются эффекты радиации и нерадиационной природы (стресс, тяжелые металлы, нитраты, нитриты), вызывая дополнительное угнетение АОС в отдаленный послеаварийный период. Это способствует развитию соматической патологии стохастической и нестохастической природы.

При изучении показателей обмена нуклеиновых кислот мы установили, что у обследованных 2-й, 3-й, а также 4-й групп концентрация ДНК в моче была достоверно выше и соответственно составляла $41,93 \pm 4,48$ мкг/мл против $18,78 \pm 2,5$ мкг/мл у доноров, $31,71 \pm 3,52$ мкг/мл против $18,78 \pm 2,5$ мкг/мл у доноров и $27,93 \pm 2,78$ мкг/мл против $18,78 \pm 2,5$ мкг/мл у доноров. У обследованных 5-й группы содержание ДНК в моче находилось в пределах нормы.

Повышение концентрации ДНК в моче обследованных, подвергшихся влиянию разных доз ионизирующего излучения, происходило на фоне повышения общей и свободной активности ДНКаз. Установлено статистически достоверное повышение общей активности ДНКаз у обследованных 2, 3-й и 4-й групп на 70, 54 и 36% и свободной активности ДНКаз на 97, 58 и 42% соответственно по сравнению с группой практически здоровых лиц. Изменений связанной активности этих ферментов у обследованных 2, 3-й и 4-й групп не обнаружено. У обследованных 5-й группы общая, свободная и связанная активность ДНКаз была в пределах нормы (рисунок).

Деградация ДНК под действием гидролизующих ферментов — ДНКаз, приводит к выходу ДНК из клеток в кровь, а затем и в мочу, что и было нами установлено у лиц, подвергшихся влиянию различных доз ионизирующего излучения. Повышение общей и свободной активности ДНКаз свидетельствует о нарушении проницаемости мембран органелл клеток, а, возможно, и об их полном разрушении.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, где описано значительное и длительное повышение активности ДНКаз в

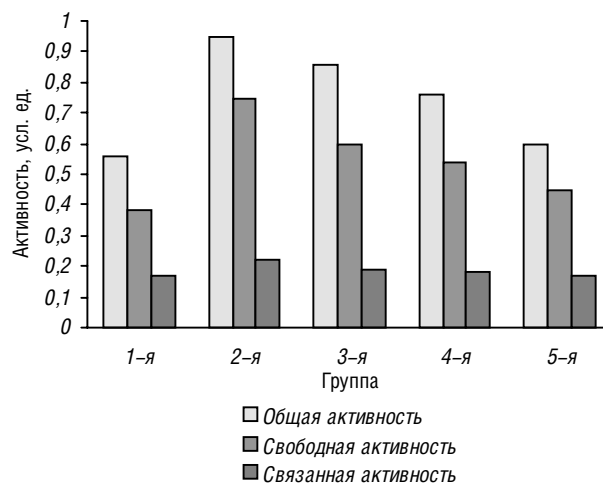


Рисунок. Активность ДНКаз в моче у лиц, подвергшихся влиянию разных доз ионизирующего излучения

крови и моче у участников ЛПА спустя 2 года после аварии. Известно, что низкие дозы ионизирующего излучения (0,1—0,4 Гр) вызывают гибель клеток, которая происходит не сразу, а в период развития отдаленных последствий после облучения, то есть отсутствие видимых изменений сразу после облучения не означает, что они не появятся в последующих генерациях облученных клеток. Механизмы, запущенные в момент облучения, то есть первичное повреждение ДНК, дефекты, вызванные ошибками репарации, с годами накапливаются, что может стать причиной соматической патологии стохастической (лейкоз, миелодиспластический синдром, солидные опухоли) и нестохастической природы.

Среди участников ЛПА в последнее время увеличилось число больных с оссалгиями и артралгиями, этиология которых требует уточнения, поскольку этот синдром часто встречается при онкогематологических заболеваниях (лейкоз, миелодиспластический синдром, остеосаркома), индуцированных ионизирующей радиацией. Накопленные в литературе данные по оценке фазового состава остеона при онкогематологической патологии свидетельствуют, что наиболее информативным методом является инфракрасная спектроскопия сухих остатков мочи и костной ткани.

Таблица

Показатели системы антиоксидантной защиты и ПОЛ у лиц, подвергшихся влиянию разных доз ионизирующего излучения (M ± m)

Группа обследованных	МДА, нмоль/мл	СОД, ед./мг Hb	Каталаза, мкмоль/(мин·мг) Hb	Фактор АОС (отн. ед.)
Доноры (1-я группа) n = 30	3,65 ± 0,11	4,37 ± 0,37	1820 ± 60	2426 ± 90
Больные, перенесшие ОЛБ II степени (2-я группа) n = 60	3,89 ± 0,23	2,08 ± 0,10 p < 0,05	872,90 ± 31,48 p < 0,05	503,85 ± 31,99 p < 0,05
Больные, перенесшие ОЛБ I степени (3-я группа) n = 65	3,92 ± 0,32	2,03 ± 0,14 p < 0,05	828,95 ± 41,63 p < 0,05	442,65 ± 40,44 p < 0,05
Участники ЛПА с дозой внешнего облучения 0,25–0,75 Гр (4-я группа) n = 80	5,87 ± 0,42 p < 0,05	3,08 ± 0,31 p < 0,05	686,68 ± 67,16 p < 0,05	387,69 ± 48,78 p < 0,05
Работники ЧАЭС с дозой внешнего облучения 0,05–0,2 Гр (5-я группа) n = 60	4,40 ± 0,24 p < 0,05	3,52 ± 0,15 p < 0,05	1034,44 ± 140,45 p < 0,05	701,52 ± 117,21 p < 0,05

Примечание. Различия достоверны (p < 0,05) относительно группы доноров.

В спектрах суточной мочи обследованных 5-й группы присутствуют интенсивные полосы поглощения, характерные для ортофосфатных соединений кальция. В этих спектрах четко проявляются полосы, соответствующие кальцию фосфорнокислому двузамещенному (CaHPO_4) и кальцию фосфорнокислому двузамещенному дигидрату ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Общими для инфракрасных спектров образцов сухого остатка суточной мочи пациентов, подвергавшихся воздействию внешнего радиоактивного излучения, являются качественные изменения в спектральном интервале, в котором присутствуют полосы поглощения, характерные для фосфатных анионов кристаллического компонента костной ткани. В этих спектрах также присутствуют полосы поглощения, характерные для пирофосфатных соединений $\text{Ca}_3\text{H}_2(\text{P}_2\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Следует подчеркнуть, что увеличение количества полос для пирофосфатов происходит при онкогематологических заболеваниях и остеосаркомах и они обусловлены появлением конденсированных фосфатных соединений, которые образуются в результате изменения химического состава неорганического компонента костной ткани.

Скорее всего, костная ткань принимает участие в патологическом процессе на ранних стадиях, что рассматривается как защитная реакция организма и свидетельствует об изменении минерального обмена у больных лейкозом. Эти изменения направлены на мобилизацию резервов (микро- и макроэлементов), которые обеспечивают нормальное течение процессов пролиферации и дифференцировки родоначальных гемопоэтических клеток. При прогрессивном развитии лейкемии возрастает потребность организма в минеральных компонентах, однако механизмы контроля процессов саморегуляции не срабатывают, что и приводит к необратимым морфофункциональным нарушениям костной ткани.

Таким образом, результаты выполненных исследований свидетельствуют о важности изучения показателей состояния липоперекисного гомеостаза, ферментативной АОС, нуклеинового обмена и минерального компонента остеона у участников ЛПА на ЧАЭС в отдаленный послеаварийный период для своевременного выявления стохастических заболеваний (лейкоз, лимфома, миелодиспластический синдром, остеосаркома) и прогноза течения многих детерминистических процессов (патология печени, почек, атеросклероз, болезни, обусловленные оксидативными стрессами).

ЛИТЕРАТУРА

1. Москалев ЮИ. Отдаленные последствия ионизирующих излучений. Москва: Медицина, 1991. 464 с.
2. Владимиров ЮА, Азизова ОА, Деев АИ. Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники. Биофизика. Москва: ВИНТИ, 1991. 249 с.
3. Барабой ВА. Особенности биологического действия ионизирующего излучения в малых дозах. Врач дело 1991; (7): 111–2.

4. Романцев ЕФ. Молекулярные механизмы лучевой болезни. Москва: Медицина, 1984. 204 с.

5. Бердышев ГД. Нуклеазы: Биологическая роль и практическое исследование. Киев: Наук думка, 1985. 145 с.

6. Андриюк ЛВ. Роль нуклеинового гомеостаза при різноманітних патологічних станах людського організму. Лік справа 1996; (3–4): 3–6.

7. Бебешко ВГ, Коровина ЛА, Дарчук СД, Ляшенко ЛА. Применение инфракрасной спектроскопии в клинической онкогематологии. В: Чернобыльская атомная электростанция — Славутич: медицинские аспекты. Киев: Вища шк, 1996: 237–48.

8. Бебешко ВГ, Дарчук ЛА, Ляшенко ЛА та ін. Спектральна діагностика структурних змін мінерального компонента кісткової тканини при онкогематологічних захворюваннях та внаслідок дії радіаційного опромінення. Пробл остеології 1998; 1: 25–30.

9. Гаврилов ВП, Гаврилова АП, Майорова ИГ. Методика определения малонового диальдегида в сыворотке крови. Вопр мед химии 1987; (1): 118–22.

10. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 1972; 274: 3170–75.

11. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. Лаб дело 1988 (1): 16–9.

12. Чевари С, Андял, Шгенгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. Лаб дело 1991; (10): 9–13.

13. Шафранский ЛЛ, Кушников ЮА. ИК-спектроскопия сухого остатка мочи при заболеваниях костей. Лаб дело 1973; (3): 47.

14. Rogoff M, Gallanger BS. Infrared spectroscopy of urine. Presse Med 1957; 69: 27.

15. Рапопорт ЖЖ, Балуева ГР. Метод ИК-спектроскопии при изучении злокачественных заболеваний крови. Красноярск: Мед инст, 1963. 340 с.

SIGNIFICANCE OF SOME MARKERS OF RADIATION DAMAGE IN DELINEATING GROUPS AT RISK OF ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES

L.A. Lyashenko, L.V. Drobinskaya,
L.A. Darchuk, N.A. Paladich

Summary. 305 men aged 35–45 (Chernobyl clean-up workers with a dose of an external exposure 0.25–0.75 Gy, the persons who had suffered from acute radiation syndrome of I and II degrees, and Chernobyl APP employees) have been studied in 1987–1997, with the control group represented by the healthy donors. The state of the antioxidant system has been assessed by the activity of superoxyde dismutase and catalase in erythrocytes and peroxide lipid oxidation level (malonic dialdehyde serum content). DNA content and DNase activity in the urine samples have been also analysed. Lipoperoxyde homeostasis has been shown to be essentially damaged in all persons exposed to ionizing radiation within the wide dose range. DNA content as well as DNase activity in urine samples of such persons turned out to increase. Significant alterations in IR spectrum have been also registered especially within the range characteristic of phosphate anions of osseous tissue crystal component.

Key Words: ionizing radiation, peroxyde oxidation of lipids, antioxidant system, DNA, RNA, infrared spectroscopy.