Український Радіологічний Журнал
© Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва (2007)
УРЖ 2007; 15: 60–65

Н.Є. Узленкова,
Є.М. Мамотюк,
В.А. Гусакова,
О.К. Кононенко

Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва АМН України, Харків

Динаміка експериментальних пневмофіброзів у щурів під впливом ікс-випромінення

Dynamics of experimental pneumofibrosis at x-ray exposure

Цель работы: Изучить динамику и характер развития экспериментального пневмофиброза (ПФ) у крыс в условиях однократного действия общего внешнего икс-облучения в дозе 6,2 Гр.

Материалы и методы: Эксперименты были проведены на 78 белых крысах-самцах массой 160–180 г. Однократное тотальное икс-облучение животных проводили на установке РУМ-17 в стандартных технических условиях. Исследования выполняли через 1, 3 и 6 месяцев после радиационного воздействия. Возрастной контроль использовали на каждый срок эксперимента. Гистологические и ультраструктурные исследования ткани легких выполняли с помощью стандартных унифицированных методик. Степень развития ПФ оценивали с помощью специально разработанной скоринг-шкалы и по результатам морфометрической оценки площадей фиброза, поверхности альвеол и капилляров. Вычисляли также сухую массу легких и содержание в них суммарного коллагена с помощью биохимических методов. При анализе корреляционной зависимости рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Статистически обрабатывали полученные данные с использованием пакета программ Biostatistics v.4.03 для Windows.

Результаты: Установлено, что однократное действие общего внешнего икс-облучения в дозе 6,2 Гр приводило к развитию радиационно-индуцированного интерстициального ПФ у крыс в сроки от 3 до 6 месяцев. Интенсивность и выраженность ПФ зависели от времени, прошедшего после облучения, и определялись степенью нарушений альвеолярной системы и площадью соединительнотканных разрастаний в респираторном отделе легких. Развитие ПФ характеризовалось достоверным возрастанием сухой массы легких и увеличением содержания суммарного коллагена в легочной ткани. Обнаружена позитивная корреляция между содержанием суммарного коллагена и морфометрическими показателями площади пневмофиброза.

Выводы: В динамике наблюдений через 3 месяца после действия внешнего икс-облучения в дозе 6,2 Гр степень развития ПФ в 71,4 % случаев достигала II, а через 6 месяцев в 14,3 % случаев — III стадии.

Ключевые слова: внешнее икс-облучение, экспериментальный пневмофиброз.

Objective: To study the dynamics and character of experimental pneumofibrosis development in rats after single external x-ray exposure at a dose of 6.2 Gy.

Material and Methods: The experiments were performed on 78 white male rats weighing 160-180 g. Single total x-ray exposure of the animals was performed using РУМ-17 unit in standard technical conditions. The study was done 1, 3 and 6 months after the exposure. Age control was done at every stage of the experiment. Histological and ultrastructural investigatons of the lung tissue were done using standard unified techniques. The degree of pneumofibrosis was assessed using a specially developed scoring scale and the findings of morphometry of the area of fibrosis, alveolar and capillary surface. Dry mass of the lungs and the amount of total collagen were determined using biochemical techniques. Spirmen coefficient was calculated to analyze the correlation. The data were processes using Biostatistics 4.03 for Windows package.

Results: It was established that single total x-ray exposure at a dose of 6.2 Gy caused development of radiation induced interstitial pneumofibrosis in rats within the term of 3-6 months. Pneumofibrosis intensity depended on the time after the exposure and was determined by the degree of alveolar system disorders and the area of connective-tissue growth in the respiratory portions of the lungs. Pneumofibrosis development was characterized by significant increase of the dry mass of the lungs and increase of total collagen amount in them. Positive correlation between the amount of total collagen and morphometric parameters of pneumofibrosis area was revealed. Conclusion: During the observation 3 months after single external x-ray exposure at a dose of 6.2 Gy the degree of pneumofibrosis development in 71.4 % of cases reached stage 2, following 6 months it reached stage 3 in 14.3 % of cases.

Key words: external x-ray exposure, experimental pneumofibrosis.

Згідно із сучасними даними, радіаційно-індуковані пневмофібрози (ПФ) є одним з найпоширеніших видів пізньої променевої патології. За даними різних авторів, частість їх виникнення складає 10–15 % в пацієнтів, опромінених з приводу раку легень, грудної залози, лімфом та тимом, і толерантність легень до опромінення достатньо обмежує можливості радіотерапії пухлин, локалізованих у зоні грудної клітки [1–3]. Незважаючи на численні клінічні та експериментальні роботи, досі не існує однозначних уявлень про характер і механізми формування радіаційних фіброзів у легенях, але показано, що їм властивий тривалий латентний період і вони значно погіршують якість життя пацієнтів у віддалені терміни після опромінювання [2–4].

Вважають, що темпи розвитку променевих фіброзів залежать від виснаження та проліферативної активності основних функціональних

клітин у легеневій тканині [5, 6]. За даними науковців [7, 8], клітинною основою формування ПФ є прискорення темпів диференціювання фібробластів і збільшення кількості зрілих фібробластів (фіброцитів), що синтезують колаген та інші компоненти сполучнотканинного матриксу. Однак якщо впливу локального терапевтичного опромінення на легеневу тканину присвячено чимало публікацій, то відносно дії тотального опромінення проведені лише окремі дослідження, присвячені, в основному, вивченню гострих променевих реакцій, і практично відсутні відомості про характер формування віддаленої променевої патології у легенях за цих умов.

Даних щодо динаміки розвитку ПФ під впливом загального зовнішнього рентгенівського випромінення у доступній літературі ми не знайшли. Отже за мету даної роботи було обрано вивчення в експерименті характеру та динаміки формування радіаційно-індукованого ПФ у щурів за умов одноразової дії загального зовнішнього ікс-випромінення.

Методика дослідження

Експерименти було проведено на 78 білих безпорідних щурах-самцях масою 160–180 г, яких утримували в стандартних умовах на звичайному раціоні віварію. Загальне зовнішнє ікс-опромінення тварин у дозі 6,2 Гр здійснювали на установці РУМ-17 за технічних умов: напруга на трубці — 200 кВ, сила струму — 10 мА, тубус F = 40 см, фільтри — 0,5 мм Cu і 1,0 мм Al. Потужність поглинутої дози дорівнювала 0,64 Гр/хв. Тварин контрольної групи піддавали псевдоопроміненню. Досліди проводили на 30-ту, 90-ту і 180-ту добу (1, 3 і 6 місяців) після радіаційного впливу. В умовах тривалого експерименту контрольну групу було використано для кожного терміну досліджень, оскільки це дало можливість врахувати вікові зміни досліджуваних показників. Тварин забивали декапітацією під легким ефірним наркозом. Вилучені легені відмивали від залишків крові холодним фізіологічним розчином і знежирювали за допомогою ефіру та ацетону. Такі тканини використовували для визначення концентрації сумарного колагену методом окиснювання гідроксипроліну в реакції його з хлораміном Т [9]. Як стандарт використовували гідроксипролін фірми Reanal. Гістологічні і ультраструктурні дослідження здійснювали стандартними уніфікованими методами. Морфометричну оцінку показників ПФ проводили на мікроскопі Axiolab Zeiss (Німеччина) використовуючи метричну окулярну сітку АМ-26 з 256 квадратів з площею одного квадрата 0,25 мм^2 та загальною площею квадрата сітки 0,64 мм^2. На гістологічних препаратах з візуально виявленими ділянками зі зміненою структурою за допомогою окулярної сітки вимірювали площу фіброзу, поверхні альвеол та капілярів не менш як у 3 полях зору мікроскопа для кожного випадку та розраховували середнє значення показника, яке виражали в умовних одиницях, як було описано раніше [10].

Статистично обробляли результати з використанням пакета Biostatistics v.4.03 для Windows за допомогою непараметричного критерію Манна–Уїтні та множинного порівняння за критерієм Крускала–Уолліса з поправкою Данна, а також t-критерію Стьюдента. Для оцінки кореляційних залежностей розраховували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена.

Результати та їх обговорення

Проведені експерименти дозволили визначити, що закономірним наслідком загального опромінення у дозі 6,2 Гр був розвиток ПФ у легенях щурів у віддалені терміни спостережень. За результатами гістологічних та ультраструктурних досліджень була розроблена скоринг-шкала, за допомогою якої проводили оцінку ступеня розвитку фіброзних змін у легенях залежно від термінів після опромінення. Було виділено три основні стадії формування експериментального ПФ (табл. 1).

На підставі отриманих даних показано, що початкова (префіброзна) стадія характеризується неспецифічними запальними реакціями різного ступеня тяжкості. Макроскопічно легені опромінених тварин у цей період були набряклими, з геморагіями, іноді — з випотом у плевральну порожнину. Мікроскопічно визначалося накопичення нейтрофілів та альвеолярних макрофагів у просвіті судин, особливо навколо дрібних судин та бронхів, і формування ділянок поліморфно-клітинної інфільтрації в інтерстиції. Це супроводжувалося розвитком інтраальвеолярного набряку, на окремих ділянках спостерігалися фрагменти деградованих колагенових фібрил з поодинокими фібробластами.

На ультраструктурному рівні визначалися зони десквамованого епітелію, вирости цитоплазми різної форми та збільшення кількості лізосом у альвеолярних макрофагах, а також стовщення базальної мембрани. Основною утворюючою фазою фіброзу (II стадія) була фаза активації клітинних реакцій з боку сполучної тканини і накопичення колагену й інших компонентів сполучнотканинного матриксу. За даними морфологічних досліджень у ці терміни на значних ділянках поля зору у легенях серед дезорганізованого матриксу спостерігалися різноманітно орієнтовані колагенові волокна та збільшені у розмірах фібробласти з яскрави-

ми базофільними ядрами. Переважно пошкоджені альвеоли різної конфігурації та зменшених розмірів розмежовувалися широкими прошарками міжальвеолярних перетинок.

На пізній (III) стадії розвитку ПФ відбувалося розростання ділянок відкладення колагену та грубоволокнистих сполучнотканинних утворень, які значно перевищували за площею ділянки дистрофічно змінених респіраторних структур. На цій стадії виявлялося стійке порушення альвеолярно-капілярної структури у легенях опромінених тварин та слабка васкуляризація легеневої тканини, нечисленні, з вузькими просвітами кровоносні судини, поодинокі старіючі фібробласти (фіброцити) і щільний сполучнотканинний матрикс. Надмірне розростання колагену в інтерстиції, заповнення ним просвітів частини капілярів та розщеплення іноді базальної мембрани спостерігалось і на ультраструктурному рівні.

Динаміку розвитку пневмофіброзу за результатами скоринг-аналізу представлено в табл. 2. Як видно з наведених даних, протягом 1 місяця після опромінювання ексудативні та запальні реакції різного ступеня тяжкості у легенях піддослідних тварин розвивалися у 80,9 % випадків, з них у понад 50 % з гострими запальними порушеннями. Такі реакції були відсутні у групі контрольних тварин. На 3-му місяці спостережень у 85,7 % досліджених ділянок у легенях опромінених тварин відзначали ознаки формування інтерстиційного ПФ, з них у

Таблиця 1

Скоринг-шкала оцінки ступеня тяжкості експериментального пневмофіброзу в щурів
Scoring scale of experimental pneumofibrosis severity in rats

Стадія пневмофіброзу	Ступінь пошкодження гістоструктури, умов. од.	Ознаки ураження
I	0,5–1,0	Неспецифічні запальні реакції та інфільтрація лімфоїдними клітинами, явища реактивних пневмонітів
II	1,5–2,0	Помірно пошкоджена мережа альвеол, альвеоли різної конфігурації, в основному зменшених розмірів
		Вузькі тяжі переважно гомогенних, місцями слабко-волокнистих прошарків з поодинокими сполучнотканинними клітинами (загальна площа таких прошарків 5–6 % площі поля зору)
	2,5–3,0	Широкі прошарки міжальвеолярних перетинок, осередкові ушкодження паренхіматозних структур
		Площа ділянок сполучнотканинних утворень — 10–15 % у полі зору
	3,5–4,0	Рідкі, дистрофічно змінені альвеоли (деформовані, зменшені і дрібні), артеріоли і капіляри переважно спазмовані
		Ушкодження паренхіматозних структур спостерігаються на значних ділянках поля зору
III	4,5–5,0	Переважання за площею грубопучкових сполучнотканинних розростань (30-40% площі в полі зору) ушкодження паренхіматозних структур на значних ділянках поля зору

Таблиця 2

Динаміка розвитку пневмофіброзу в щурів після одноразового зовнішнього ікс-опромінення у дозі 6,2 Гр
Dynamics of pneumofibrosis development in rats following single external x-ray exposure at a dose of 6.2 Gy

Термін досліду, міс.	Дослід	n	Ступінь фіброзу, стадія					
			I	II				III
			0 умов. од.	0,5–1,0 умов. од.	1,5–2,0 умов. од.	2,5–3,0 умов. од.	3,5–4,0 умов. од.	4,5–5,0 умов. од.
			абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %	абс. / %
1	Контроль	16	16 / 100	—	—	—	—	—
	Опромінення	21	2 / 9,5	17 / 80,9	2 / 9,5	—	—	—
3	Контроль	19	18 / 94,7	—	1 / 5,3	—	—	—
	Опромінення	21	2 / 9,5	3 / 14,3)	10/ 47,6	5 / 23,8	1 / 4,8	—
6	Контроль	17	14 / 82,4	—	3 / 17,6	—	—	—
	Опромінення	21	2 / 9,5	—	1 / 4,8	9 / 42,8	6 / 28,6	3 / 14,3

47,6 % загальна площа колагенових розростань не перевищувала 5—6 % поля зору і ступінь розвитку фіброзу складав 1,5—2,0 умов. од., але в 23,8 % випадків — 2,5—3,0 умов. од., а в 4,8 % ушкодження паренхіматозних структур досягали 3,5—4,0 умов. од. ступеня тяжкості. Такі ознаки були практично відсутні при дослідженні легень у групі контрольних тварин у ці терміни. Наприкінці досліджень, тобто через 6 місяців після опромінення, максимальний ступінь ПФ 4,5—5,0 умов. од. з переважанням за площею сполучнотканинних розростань у легенях опромінених тварин визначалися в 14,3 % досліджених ділянок. У 28,6 % випадків ступінь фіброзу складав 3,5—4,0 умов. од. і в 42,8 % — не перевищував 2,5—3,0 умов. од. У групі відповідного вікового контролю в ці терміни невеликі за площею розростання гомогенних колагенових структур спостерігалися в 17,6 % досліджених ділянок, але були пов'язані із віковими змінами паренхіматозних структур у легенях. На рис. 1 представлено усереднені дані оцінки ступеня ПФ у групах піддослідних тварин залежно від термінів після опромінення.

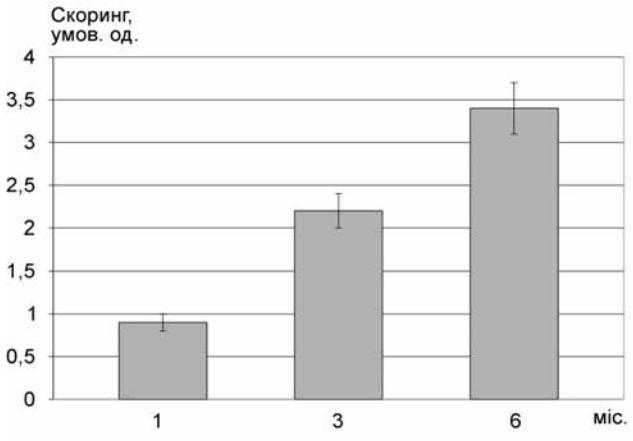

Рис. 1. Скоринг-оцінка ступеня пневмофіброзу в щурів після одноразового зовнішнього ікс-опромінення в дозі 6,2 Гр (усереднені дані, умов. од.)

Fig. 1. Score evaluation of pneumofibrosis degree following single external x-ray exposure at a dose of 6.2 Gy (mean data, conventional units)

Характер змін морфометричних показників ПФ залежно від динаміки його розвитку наведено на рис. 2. Як видно з нього, закономірним наслідком загального опромінення у дозі 6,2 Гр було збільшення площі фіброзно змінених ділянок та зменшення функціонально активної площі альвеол у респіраторному відділі легень у

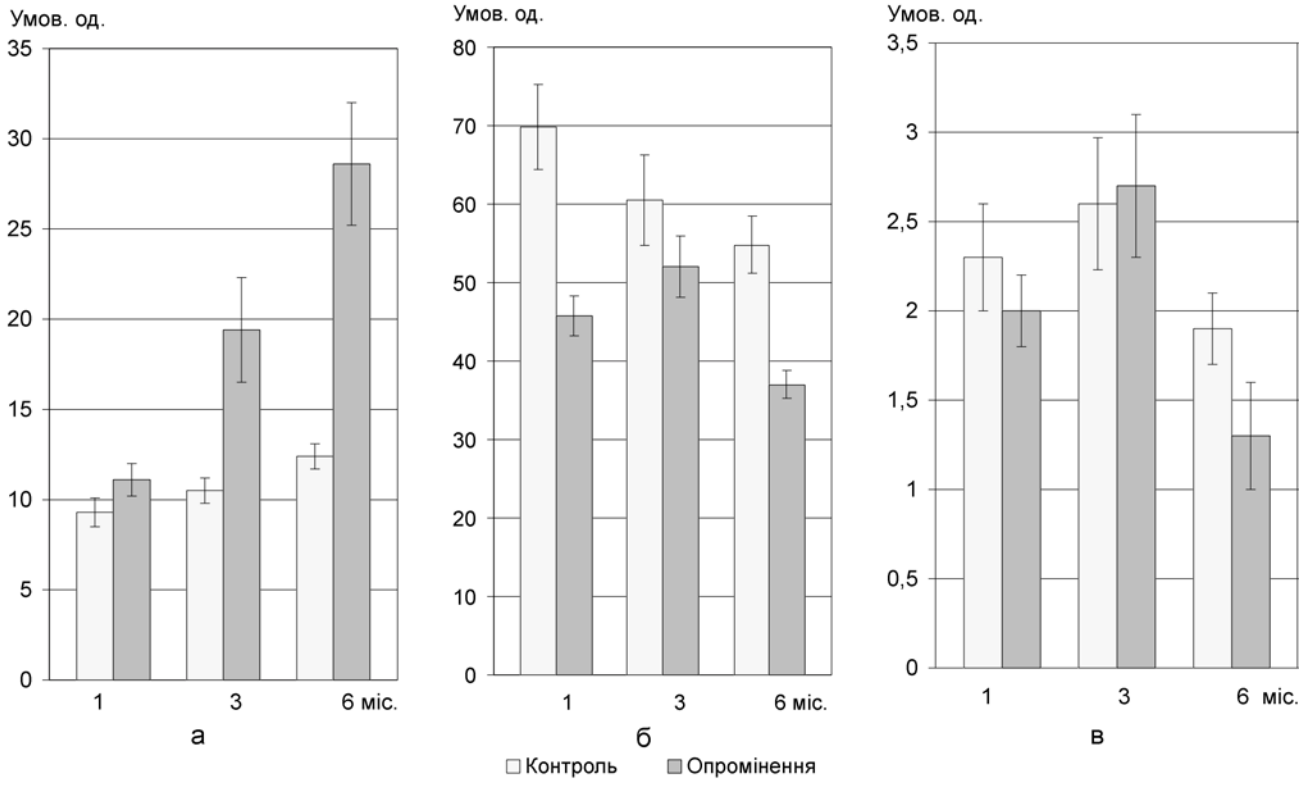

Рис. 2. Динаміка змін морфометричних показників у легенях щурів після одноразового зовнішнього ікс-опромінення в дозі 6,2 Гр (умов. од.), площа: а — фіброзу, б — альвеол, в — капілярів

Fig. 2. Dynamics of morphometric parameters changes in the lungs of the rats following single external x-ray exposure at a dose of 6.2 Gy (conventional units), area: а — fibrosis, б — alveoli, в — capillaries

віддалені терміни спостережень. Окремі ділянки з порушеною гістоструктурою, характерною для початку розвитку фіброзу, виникали вже наприкінці 1-го місяця після опромінювання, але вірогідні зміни визначалися на 3-й і 6-й місяці спостережень. У ці терміни після опромінювання загальна площа сполучнотканинних новоутворів у легенях піддослідних тварин дорівнювала 19,4 та 28,6 умов. од. і вірогідно перевищувала площу окремих ділянок відкладення колагену у легенях відповідного до вікового контролю в 1,8 ($\rho = 0,01$) і 2,2 ($\rho = 0,001$) разу. Водночас уже протягом 1-го місяця спостережень в 1,5 разу ($\rho = 0,02$) скорочувалася загальна площа альвеол у легенях опромінених тварин, але на цьому етапі розгортання запальних реакцій це зумовлювалося, в основному, інтерстиційним набряком міжальвеолярних перетинок та накопиченням ексудату у вільному просвіті альвеол.

В міру формування ПФ та збільшення загальної площі сполучнотканинних розростань у легенях на 3-му і 6-му місяці після опромінювання, активна поверхня альвеол, доступна для вентиляції, вірогідно зменшувалася відповідно в 1,2 ($\rho = 0,01$) і 1,4 ($\rho = 0,001$) разу, і наприкінці досліджень дорівнювала 37,0 умов. од. проти 54,8 у контролі. Крім того, стійке порушення альвеолярно-капілярної структури, виявлене в легенях піддослідних тварин через 6 місяців після опромінювання, виражалося також у вірогідному зменшенні відносної площі капілярів в 1,5 ($\rho = 0,04$) разу порівняно з контролем.

У табл. 3 наведено характеристики інтенсивності формування ПФ за даними вмісту сумарного колагену та зміни сухої маси легень у групах контрольних і опромінених тварин. Як бачимо, досліджувані показники у групах опромінених тварин були статистично вірогідно вище таких у контролі. Розвиток ПФ характеризувався збільшенням вмісту сумарного колагену в легенях у 1,3 ($\rho = 0,037$) разу вже через 1 місяць після променевої дії, і далі, у середньому, в 1,4 разу на 3-му і 6-му місяцях спостережень. Водночас маса легень опромінених тварин вірогідно зростала, починаючі з 3-го місяця після опромінювання, і перевищувала значення показника у групах контрольних тварин відповідно, в 1,27 ($\rho = 0,053$) і 1,39 ($\rho = 0,031$) разу у віддалені терміни спостережень. За результатами кореляційного аналізу позитивні кореляційні залежності було встановлено між показниками вмісту сумарного колагену та площею фіброзу у легенях опромінених тварин. Отримані дані з розрахунку коефіцієнта рангової кореляції Спірмена у групах контрольних і піддослідних тварин наведено в табл. 4. Як видно з неї, вірогідні зміни коефіцієнта кореляції між біохімічними та морфометричними показниками у легенях опромінених тварин були визначені у більш пізні терміни — на 3-й і 6-й місяці спостережень.

Отже, на основі отриманих даних встановлено, що закономірним наслідком одноразової дії загального зовнішнього ікс-опромінення у дозі 6,2 Гр був розвиток інтерстиційного ПФ різного ступеня тяжкості у легенях опромінених тварин у віддалені терміни (від 3 до 6 місяців) після променевої дії. Інтенсивність та вираженість проявів ПФ залежали від часу, що минув після неї, і визначалися ступенем порушення альвеолярної системи та величиною площі

Таблиця 3

Показники інтенсивності формування пневмофіброзу в щурів після одноразового зовнішнього ікс-опромінення у дозі 6,2 Гр

Parameters of pneumofibrosis development intensity in rats following single external x-ray exposure at a dose of 6.2 Gy

Термін досліду, міс.	Дослід	n	Суха маса легень, мг		Сумарний колаген, мкмоль гідроксипроліну/г тканини	
			$\overline{X} \pm \overline{Sx}$	S	$\overline{X} \pm \overline{Sx}$	S
1	Контроль	9	350,9 ± 21,7	65,1	47,4 ± 3,0	9,2
	Опромінення	10	379,5 ± 16,3, p=0,301	51,6	60,6 ± 4,7, p = 0,037	14,9
3	Контроль	8	376,0 ± 23,2	65,4	51,3 ± 3,7	10,6
	Опромінення	10	477,9 ± 19,8, p=0,053	62,5	72,3 ± 4,0, p = 0,013	12,5
6	Контроль	9	477,9 ± 29,3	88,0	56,2 ± 3,6	10,9
	Опромінення	10	602,5 ± 22,7, p=0,031	71,7	78,1 ± 4,7, p = 0,012	14,7

Таблиця 4

Кореляція біохімічних та морфометричних показників у легенях щурів після одноразового зовнішнього ікс-опромінення у дозі 6,2 Гр
Correlation of biochemical and morphological parameters in the lungs of the rats following single external x-ray exposure at a dose of 6.2 Gy

Термін досліду, міс.	Дослід	Коефіцієнт кореляції Спірмена	p
1	Контроль	0,589	0,113
	Опромінення	0,678	0,089
3	Контроль	0,643	0,110
	Опромінення	0,893	0,012
6	Контроль	0,767	0,019
	Опромінення	0,976	0,039

сполучнотканинних розростань у респіраторному відділі легень. Це супроводжувалося вірогідним збільшенням маси легень та вмісту сумарного колагену у легеневій тканині у віддалені терміни після опромінювання.

Висновки

1. Одноразова дія загального зовнішнього ікс-опромінення у дозі 6,2 Гр призводила до розвитку інтерстиційного пневмофіброзу різного ступеня тяжкості у 80,9 % експериментальних тварин у терміни від 3 до 6 місяців після променевого впливу.

2. Інтенсивність і вираженість проявів фіброзних змін залежали від часу, що минув після опромінювання, і визначалися ступенем порушення альвеолярної системи та розміром площі сполучнотканинних розростань у респіраторному відділі легень.

3. У динаміці спостережень протягом 3 місяців після променевого впливу ступінь розвитку пневмофіброзу у 71,4 % випадків не перевищував II стадію і через 6 місяців максимальні зміни (пневмофіброз III стадії) констатовано в 14,3 % випадків.

4. Встановлено позитивну кореляцію між змінами вмісту сумарного колагену у тканині та морфометричними показниками площі пневмофіброзу у легенях опромінених тварин на 3-й і 6-й місяці спостережень.

Література

1. *Borgmann K., Roper B., El-Awady R. et al. // Radiother. Oncol. — 2002. — Vol. 64. — P. 121–152.*
2. *Denham J., Hauer-Jensen M. // Ibid. — Vol. 63. — P. 129–145.*
3. *Border J., Komperman H., Silleris Smitt H. et al. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 1994. — Vol. 30. — P. 1073–1081.*
4. *Cosset J.-M. // Radiother. Oncol. — 2002. — Vol. 63. — P. 1–10.*
5. *Burger A., Loffler H., Bamberg M., Rodemann H. // Int. J. Radiat. Biol. — 1998. — Vol. 73. — P. 401–408.*
6. *Антонюк С.В., Коцарев О.С., Лихолат О.А. // УРЖ. — 2002. — Т.X, вип. 3. — С. 249–253.*
7. *Roderman S., Bamberg M. // Radiother. and Oncol. — 1995. — Vol. 35. — P. 83–90.*
8. *Delaman S., Lefaix J-L. // Ibid. — 2004. — Vol. 73. — P. 119–131.*
9. *Замараева Т.В. // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1997. — С. 262–264.*
10. *Узленкова Н.Є., Мамотюк Є.М., Гусакова В.А., Кононенко О.К. // УРЖ. — 2006. — Т. XIV, вип. 4. — С. 432–438.*

Надходження до редакції 12.03.2007.

Прийнято 20.03.2007.

Адреса для листування:
Узленкова Наталія Євгенівна,
ІМР ім. С.П. Григор'єва АМНУ,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна