

М.О. Клименко,
О.С. Варваричева

Харківський державний
медичний університет

Експресія білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки щурів при дії низькоінтенсивного гамма-випромінення на фоні хронічного запалення

p53 expression in thymus and spleen
lymphocytes of the rats exposed to low-dose
gamma-radiation against a background
of chronic inflammation

Цель работы: Изучить влияние низкоинтенсивного γ -излучения на экспрессию белка p53 в лимфоцитах тимуса и селезенки крысы на фоне хронического воспаления.

Материалы и методы: Работа выполнена на 102 крысах-самцах линии Вистар. Хроническое воспаление вызывали введением 4 мл 2%-ного раствора карагинена в предварительно подготовленный подкожный воздушный мешок. Облучение проводили к 3-м и 7-м суткам воспаления в дозах 0,1; 0,5; 1,0 Гр при мощности дозы 20 мГр/ч. Выводили животных из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом. Экспрессию белка p53 изучали иммуногистохимическим методом в лимфоцитах тимуса и селезенки.

Результаты: Хроническое воспаление сопровождается усилением экспрессии белка p53 в лимфоцитах тимуса и селезенки крысы, достигающим максимума к 3-м суткам воспаления, в пик макрофагально-лимфоцитарной реакции. В лимфоцитах селезенки такая экспрессия белка p53 значительно более выражена, чем в лимфоцитах тимуса. Установлена линейная дозовая зависимость экспрессии белка p53 в лимфоцитах тимуса и селезенки независимо от срока воспаления во всех экспериментальных группах с крайне незначительным повышением экспрессии p53 при дозе 0,1 Гр.

Выводы: Слабая экспрессия белка p53 при дозе 0,1 Гр, указывающая на низкий уровень онкосупрессорной активности, наряду с интенсивной лимфоцитарной пролиферацией при данной дозе может свидетельствовать о высокой вероятности реализации онкогенного потенциала хронического воспаления, в частности, в лимфоидных органах.

Ключевые слова: хроническое воспаление, низкоинтенсивное γ -излучение, белок p53, лимфоциты.

Objective: To study dose-dependence of p53 expression in lymphocytes of thymus and spleen at low-dose γ -irradiation.

Material and Methods: The study was performed on 102 male Wistar rats. Chronic inflammation was induced by injection of carrageenan solution into a previously prepared subcutaneous air pouch. Irradiation was performed on the 3rd and 7th days of inflammation at a dose of 0.1, 0.5, 1.0 Gy and dose-rate 20 mGy/h. p53 expression was estimated using immunohistochemical assay in lymphocytes of the thymus and spleen.

Results: Chronic inflammation was accompanied by increased p53 expression in lymphocytes of thymus and spleen. Maximal expression was revealed on the 3rd day of inflammation at the peak of macrophage-lymphocyte reaction. p53 was more expressed in spleen lymphocytes than in thymus lymphocytes. Linear dose-dependence of p53 expression was determined in all animal study groups with minor increase of p53 expression at a dose of 0.1 Gy.

Conclusion: The low value of p53 expression at dose 0.1 Gy obtained in this study shows low level of oncogen suppression activity in respect of high proliferation of lymphocytes in thymus and spleen, which indicates high risk of implementation of oncogenic potential at chronic inflammation, including in lymphoid organs.

Key words: chronic inflammation, low-dose γ -radiation, p53 expression, lymphocytes.

Питання біологічної дії іонізуючого випромінення, яке постало на початку 20-го століття, залишається актуальним і донині, незважаючи на величезну кількість проведених досліджень у цій галузі. Особливо цікавим на сьогодні є вивчення ефектів і механізмів дії іонізуючого випромінення з малою лінійною втратою енергії при малих потужностях дози й у малих дозах. Підставою для подібного твердження є епідеміологічні дослідження наслідків катастрофи на ЧАЕС [1, 2] і атомних бомбардувань у Хіросімі й Нагасакі [3]. Основним біологічним ефектом випромінення з такими параметрами є розвиток злоякісних пухлин у різних

органах і тканинах опроміненого організму. На це вказують і результати численних робіт з радіаційного канцерогенезу [4].

Як відомо, відповідно до правила Бергоньє й Трибондо, найчутливішими до впливу опромінення є органи імунної й кровотворної систем. Гостре опромінення в більших дозах справляє імунодепресивну дію [5] за рахунок різкого зниження проліферативної активності клітин у органах імунної системи, насамперед, лімфоцитів, які починають гинути шляхом апоптозу вже при дозах 0,25–1,00 Гр [6]. Однак, як відзначено в аналітичному звіті Ю.С. Рябухіна [7], існують експериментальні дані про те, що малі дози

стимулюють імунну систему. Особливо вразливою відносно дії іонізуючої радіації лімфоїдна тканина, певно, стає за наявності хронічного запалення в організмі, оскільки, як відомо, лімфоїдна реакція переважає при хронічному запаленні й багато в чому визначає інші клітинні реакції [8]. Крім того, радіаційний канцерогенез за наявності хронічного запалення як фону, мабуть, набуває якісно нового характеру, бо таке запалення саме по собі є важливим чинником виникнення злоякісних новоутворів, оскільки характеризується інтенсивною клітинною проліферацією, що продемонстровано в численних експериментах на тваринах [3, 9, 10]. Агентами, що ушкоджують ДНК, при цьому можуть виступати вільні форми кисню й окис азоту, які належать до основних медіаторів запалення [11].

Метою дослідження стало вивчення впливу низькоінтенсивного γ -випромінювання на експресію білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки щурів на фоні хронічного запалення.

Для з'ясування особливостей реалізації онкогенного потенціалу у лімфоїдній тканині при дії такого випромінювання на фоні хронічного запалення нами було вивчено експресію білка p53 як головного білка-онкосупресора [12] у лімфоцитах тимуса й селезінки щурів.

Методика дослідження

Роботу виконано на 102 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г (по 6 тварин у групі). Як модель хронічного запалення було обрано карагіненове асептичне гранулематозне запалення. Під шкіру спини тварини вводили по 8 мл стерильного повітря. Через 24 години у отриманий підшкірний мішок вводили 4 мл 2 % -ного розчину λ -карагінену в ізотонічному розчині NaCl [8]. Розчин карагінену був стерилізований автоклавуванням при 121 °C упродовж 15 хв. Усі процедури виконували під ефірною анестезією. Для опромінювання використовували джерело γ -променів ОВ-6, Німеччина (^{137}Cs , 20 Ci, 14,3 мкГр/год на відстані 1 м). Тварини отримали дози 0,1, 0,5 і 1,0 Гр протягом 4, 8, 24 і 48 годин відповідно. Доза у 0,1 Гр лежить у ділянці так званих «малих доз» (менше 0,2 Гр або 1 трек на ядро); 1,0 Гр є класичною радіобіологічною дозою; 0,5 Гр лежить у проміжній ділянці. Тварин першої серії опромінювали до 3-ї доби запалення і забивали декапітацією під ефірним наркозом відразу після опромінювання та на 7-му добу запалення. Тварин другої серії опромінювали до 7-ї доби запалення із забиванням відразу по закінченні опромінювання й на 14-ту добу запалення. Контролем були тварини, у яких викликали запалення, але опромінюванню не піддавали. Контрольні показники порівнювали з даними інтактних щурів.

Експресію білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки визначали імуногістохімічним методом на парафінових

гістологічних зрізах. Для визначення білка p53 використовували первинні мишачі моноклональні антитіла до білка p53 виробництва компанії Dako (США) — Dako Mouse Anti-p53 PAb240 і лабораторну систему DakoCytomation EnVision + Dual Link System-HRP (DAB+) [13].

Мікроскопічне вивчення препаратів проводили з використанням мікроскопа Olympus VX51 при збільшенні $\times 400$. Експресію білка p53 визначали за характерним оранжево-коричневим забарвленням ядер лімфоцитів. Показником інтенсивності експресії білка p53 був p53-індекс у тимусі й селезінці.

$$p53\text{-індекс} = \frac{\text{Кількість лімфоцитів, що експресують білок p53}}{\text{Загальна кількість лімфоцитів (100\%)}}$$

Для статистичної обробки використовували непарний тест Стьюдента. Статистично вірогідними вважали результати з $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

У табл. 1 наведено дані про експресію білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки тварин, опромінюваних до 3-ї доби запалення й виведених з експерименту безпосередньо після променевої дії (негайний ефект) і через 4 доби після неї (відстрочений ефект). Як видно з табл. 1, експресія білка p53 найбільш виражена на 3-тю добу запалення, причому особливо у лімфоцитах селезінки — вдвічі більше, ніж у тимусі. При вивченні ж відстроченого ефекту виявлено, що експресія білка p53 значно нижча, ніж у тварин, яких виводили з експерименту відразу після опромінювання (в середньому у 3–4 рази). Відзначена закономірність простежується як у контролі (p53-індекс у лімфоцитах тимуса й селезінки інтактних тварин склав $3 \pm 0,4$ і $2 \pm 0,4$ відповідно), так і у опромінених тварин.

Таблиця 1

Експресія p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки при опромінюванні тварин до 3-ї доби запалення p53 expression in the lymphocytes of the thymus and spleen at exposure to radiation before day 3 of inflammation

Доза, Гр	Ефект			
	негайний		відстрочений (через 4 доби)	
	p53-індекс у лімфоцитах			
	тимуса	селезінки	тимуса	селезінки
0 (контроль)	11,1 \pm 2,3	22,4 \pm 2,7	4,1 \pm 1,1	6,1 \pm 2,1
0,1	15,2 \pm 3,1	37,5 \pm 6,3	5,3 \pm 0,98	12,2 \pm 3,2
0,5	27,5 \pm 7,5	42,2 \pm 7,1*	9,2 \pm 2,5	16,5 \pm 4,8
1,0	41,1 \pm 10,2*	53,2 \pm 11,1*	15,3 \pm 7,6*	21,6 \pm 5,4*

* Тут і в табл. 2: вірогідно відносно контролю з $p \leq 0,05$.

Дозова залежність експресії білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки при вивченні негайного ефекту є практично лінійною. При найменшій досліджуваній дозі — 0,1 Гр така експресія збільшується порівняно з контролем у 1,3 разу для тимуса і в 1,6 — для селезінки; при дозі 0,5 Гр — відповідно в 2,4 й 1,8, при 1,0 Гр — в 3,7 й 2,3 разу. Слід зазначити, що вірогідне підвищення експресії p53 спостерігається при найбільшій дозі опромінення — 1,0 Гр у лімфоцитах як тимуса, так і селезінки, а також при дозі 0,5 Гр у лімфоцитах селезінки.

При вивченні дозової залежності у випадку відстроченого ефекту можна відзначити, що експресія білка p53, як і в попередній групі, лінійно зростає з дозою опромінення у лімфоцитах як тимуса, так і селезінки. У тимусі збільшення експресії p53 при дозі 0,1 Гр є незначним порівняно з контролем (в 1,3 разу), у селезінці посилення експресії при цій же дозі істотніше (у 2 рази), однак в обох випадках невірогідне. При дозі опромінення 0,5 Гр також спостерігається тенденція до збільшення експресії p53 — в 2,2 разу в лімфоцитах тимуса й в 2,7 — у лімфоцитах селезінки. Водночас при опроміненні в дозі 1,0 Гр вірогідно збільшується експресія білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки (в 3,7 і 3,5 разу відповідно).

У табл. 2 наведено дані про експресію білка p53 у лімфоцитах тимуса та селезінки щурів, яких опромінювали до 7-ї доби запалення й виводили з експерименту негайно після променевої дії, а також через 7 діб після неї (на 14-ту добу запалення) для вивчення відстроченого ефекту.

Таблиця 2

Експресія p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки при опромінюванні тварин до 7-ї доби запалення
p53 expression in the lymphocytes of the thymus and spleen at exposure to radiation before day 7 of inflammation

Доза, Гр	Ефект			
	негайний		відстрочений (через 7 діб)	
	p53-індекс у лімфоцитах			
	тимуса	селезінки	тимуса	селезінки
0 (контроль)	5,1±1,7	6,4±2,3	0	0
0,1	11,3±2,1	15,2±4,1	2,8±0,8	4,0±1,1
0,5	23,1±4,7*	32,1±8,8*	4,2±1,1	5,8±2,1
1,0	30,2±6,1*	41,8±11,1*	4,2±1,3	6,3±2,3

Експресія p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки на 7-му добу запалення значно нижча такої на 3-тю, а на 14-ту добу запалення взагалі відсутня. При опромінюванні експресія білка p53 зростає з дозою опромінення, а у тварин, на яких вивчали відстрочений ефект, такий білок виявляється у лімфоцитах тимуса й селезінки.

Дозова залежність експресії p53 у тварин, на яких вивчали негайний радіаційний ефект, має майже лінійний характер. При дозі 0,1 Гр експресія збільшується у 2 рази в тимусі й у 2,3 — у селезінці, однак виявлене збільшення не є статистично вірогідним. Водночас опромінення в дозах 0,5 Гр і 1,0 Гр призводить до значного посилення експресії білка p53 у лімфоцитах як тимуса (в 4,5 і 5,9 разу відповідно), так і селезінки (в 5,0 і 6,5 разу відповідно).

Як зазначалося, при вивченні відстроченого ефекту у тканині тимуса й селезінки з'являються лімфоцити, в ядрах яких експресується білок p53, причому зі збільшенням дози опромінення така експресія зростає, однак незначно. Загалом у тварин цієї групи (опромінювання до 7-ї доби запалення, виведення з експерименту на 14-ту добу запалення) спостерігаються найнижчі з усіх експериментальних груп значення експресії білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки.

Зацікавлює також, що експресія білка p53 у тимусі й селезінці інтактних тварин не є нульовою, як у тварин із запаленням (контроль) на 14-ту добу.

Як відомо, білок p53 — універсальний і основний ядерний білок-онкосупресор — експресується в тих клітинах, де ступінь ушкодження геному досяг такого рівня, коли звичайні механізми репарації не здатні їх виправити й забезпечити подальше нормальне функціонування клітини, і перешкоджати передачі придбаних поломок ДНК майбутнім поколінням клітин, забезпечивши таким чином стійке в часі порушення структури ДНК, тобто мутацію. Такими ушкодженнями найчастіше є двониткові розриви ДНК. Небезпека мутацій у дорослому організмі полягає насамперед у можливій пухлинній трансформації мутованої клітини й наступному розвитку новоутвору. Функція білка p53 полягає в розпізнаванні пошкодження ДНК і виведенні клітини із клітинного циклу у фазу G₀ або в ініціації апоптозу [12].

Дані про експресію p53 у лімфоїдних органах при дії низькоінтенсивного γ -випромінення на фоні хронічного запалення становлять, на нашу думку, великий інтерес, оскільки дозволяють оцінити ризик розвитку пухлинного процесу в лімфоїдній тканині, найбільш чутливій до радіації, в умовах хронічного запалення, найпоширенішого типового патологічного процесу, який сам по собі є передпухлинним станом.

Аналіз отриманих результатів показує, що при запаленні інтенсивність експресії білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки зростає порівнянно з такою у інтактних тварин, за винятком запалення, в термін 14 діб. Збільшення може бути пов'язане з підвищеним ушкодженням ДНК медіаторами запалення, на що вказує пік у збільшенні експресії на 3-тю добу запалення, коли, як відомо, переважає макрофагально-лімфоцитарна реакція. Лімфоцитарна реакція характеризується підвищеною проліферативною активністю [14, 15] і, відповідно, більшою чутливістю відносно факторів, що ушкоджують ДНК. Макрофагальна реакція супроводжується «оксидантним вибухом», що призводить до збільшення вмісту активних форм кисню й азоту, причому не тільки у вогнищі запалення й крові [16, 17], а й в інших органах і тканинах, і особливо, мабуть, в органах периферичної лімфатичної системи, безпосередньо функціонально пов'язаних з осередком запалення. На 7-му добу запалення, коли макрофагально-лімфоцитарна реакція стихає і на зміну їй приходить фібробластична реакція, інтенсивність експресії p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки знижується й наближається до значень у групі інтактних тварин. Відсутність експресії p53 на 14-ту добу запалення, очевидно, можна пояснити апоптотичною загибеллю потенційно уразливих відносно ушкодження ДНК клітин, що вже відбулася протягом попереднього перебігу запалення.

Дія низькоінтенсивного γ -випромінення в усіх експериментальних групах веде до практично лінійного росту експресії білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки з дозою опромінення, незалежно від терміну запалення. При цьому вірогідне підвищення експресії щодо контролю спостерігається лише при дозі 1,0 Гр і в низці випадків — при дозі 0,5 Гр. На лінійну

дозову залежність експресії p53 у клітинах вогнища хронічного запалення при аналогічній постановці експерименту вказують також результати роботи [18]. Подібна, на перший погляд проста, закономірність клітинної відповіді, очевидно, не може бути випадковою. По-перше, саме простота захисної реакції може бути запорукою успішної реалізації цієї реакції. По-друге, оскільки будь-яка захисна реакція має потребу в певних пластичних і енергетичних ресурсах і найчастіше призводить до часткової втрати власних клітин і тканин, існує поріг, вище якого така реакція реалізується, причому найчастіше незалежно від характеру фактора, що ушкоджує, а нижче — корисне пристосувальне значення у цій захисній реакції відсутнє. При цьому поріг кожної захисної реакції формується в процесі еволюції тієї чи іншої системи. Слід зазначити, що параметри γ -випромінення, використані в даному експерименті, належать до низькоінтенсивного γ -випромінення, зокрема в малих дозах, яке було відсутнє в навколишньому середовищі у процесі еволюційного розвитку систем підтримки стабільності геному. У наш час численних техногенних радіаційних катастроф та внаслідок надмірного опромінення в медичних установах, недотримання правил техніки безпеки тощо, організм людини зазнає дії низькоінтенсивного γ -випромінення — фактора, що діє на межі спрацьовування протирадіаційних захисних механізмів. У цих умовах особливо висока ймовірність реалізації онкогенного потенціалу хронічного запалення, що супроводжується інтенсивною лімфоцитарною проліферацією, у лімфоїдних органах.

ВИСНОВКИ

1. Хронічне запалення супроводжується посиленням експресії білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки щурів, максимальним на 3-тю добу запалення, у пік макрофагально-лімфоцитарної реакції.

2. Експресія білка p53 у лімфоцитах селезінки виражена значно більше, ніж у лімфоцитах тимуса, що може бути наслідком більшої функціональної близькості периферичної лімфатичної системи до вогнища запалення.

3. Встановлено лінійну дозову залежність експресії білка p53 у лімфоцитах тимуса й селезінки незалежно від строку запалення з вкрай незначним підвищенням експресії p53 при дозі 0,1 Гр. Низький рівень активації системи стабільності геному поряд з інтенсивною лімфоцитарною проліферацією при зазначеній дозі може свідчити про високу ймовірність реалізації онкогенного потенціалу хронічного запалення, зокрема у лімфоїдних органах.

Література

1. Henshaw D.L. // *Brit. Med. J.* — 1996. — Vol. 312. — P. 1052–1053.
2. Preston D., Hiroo K., *Studies of the Mortality of A-Bomb Survivors. Report 8. Cancer Mortality 1950-1982 (RERF TR-1-86)* // *Radiat. Res.* — 1986. — Vol. 111. — P.151–178.
3. Dyer R.D. *Meeting report* // *Inflamm. Res.* — 2002. — Vol. 51, № 2. — P. 71–72.
4. Бурлакова Е.В., Голощапов А.Н., Горбунова Н.В. и др. // *Радиаци. биол. Радиоэкол.* — 1996. — Т. 36, № 4. — С. 610–632.
5. Ярилин А.А. // *Там же.* — 1999. — Т. 39, № 1. — С. 181–189.
6. Neta R. *Radiation effects on immune system* // *Immunological Encyclopedia.* — London, 1992. — P. 1298–1301.
7. Рябухин Ю.С. // *Мед. радиол. и радиац. безопасн.* — 2000. — Т. 45, № 4. — С. 5–45.
8. Ghosh A.K., Hirasawa N., Niki H., Ohuchi K. // *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* — 2000. — Vol. 295. — P. 802–809.
9. Murthy S., Winkler J.D. // *Inflamm. Res.* — 2002. — Vol. 51, № 2. — P. 76.
10. Ames B.N., Swirsky Gold L., Willett W.C. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 5258–5265.
11. Dreher D., Junod A.F. // *Eur. J. Cancer.* — 1996. — Vol. 32A. — P. 30–38.
12. Levine A.J. // *Cell.* — 1997. — Vol. 88. — P. 323–331.
13. Brambilla E., Gazzeri S., Moro D., Caron de Fromental C., Gouyer V. // *Am. J. Path.* — 1993. — Vol. 143, № 1. — P. 199–204.
14. Клименко Н.А., Сорокина И.В., Варваричева О.С. // *Медицина сьогодні і завтра.* — 2006. — № 3–4. — С. 42–49.
15. Клименко Н.А., Сорокина И.В., Варваричева О.С. // *Експерим. и клін. мед.* — 2006. — № 4. — С. 18–23.
16. Клименко М.О., Онищенко М.І. // *УРЖ.* — 2004. — Т. XII, вип. 1. — С. 45–48.
17. Онищенко М.І. // *Експерим. и клін. мед.* — 2005. — № 3. — С. 118–121.
18. Клименко Н.А., Onyshchenko M.I. // *УРЖ.* — 2005. — Т. XIII, вип. 2. — С. 184–187.

Надходження до редакції 13.12.2006.

Прийнято 06.02.2007.

Адреса для листування:
Клименко Микола Олексійович,
Харківський державний медичний університет,
пр-т Леніна, 4, Харків, 61022, Україна
e-mail: pathophys@Khdmu.bestnet.Kharkov.ua