

УДК 616-001.27+616.5-001.29

Н. Є. Узленкова✉

Державна установа “Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор’єва Національної академії медичних наук України”, вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна

РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ У СПОЛУЧНОТКАНИННОМУ МАТРИКСІ ОРГАНІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЗАГАЛЬНОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

Мета. Вивчити характер радіаційно-індукованих змін у сполучнотканинному матриксі органів щурів за умов одноразового загального зовнішнього рентгенівського опромінення у мінімально летальній та сублетальній дозах.

Матеріали і методи. Досліди проводили на білих щурах-самцях масою 160–180 г, яких піддавали впливу рентгенівського випромінювання у дозах ЛД_{15/30} і ЛД_{60/30} на установці РУМ-17 за стандартних технічних умов. Оцінку сполучнотканинного матриксу проводили за сумарною кількістю колагену, розчинного (РК) і нерозчинного (НК) колагену, швидкістю руйнування колагену за вільним гідроксипроліном, колагенолітичною активністю (КЛА), індивідуальними глікозаміногліканів (ГАГ). Досліди проводили на 3, 7 і 14-ту та 30, 90 і 180-ту добу. Віковий контроль використовували на кожен термін дослідів. Статистичну обробку даних проводили за використанням критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні та t-критерію Стьюдента за допомогою пакета Biostatistics v.4.03 для Windows.

Результати. Встановлені зміни колагену (3–7-а доба) характеризувалися порушенням співвідношення РК і НК, прискоренням розпаду колагену за вільним гідроксипроліном у легенях – в 1,7 раза, шкірі – в 1,2 раза, зростанням металозалежної КЛА у легенях – в 2,0 рази й металонезалежної КЛА у шкірі – в 2,2 раза, збільшенням гіалуринової кислоти у легенях – в 1,7 раза, шкірі – в 1,5 раза. У віддаленому періоді (180-а доба) визначали зростання сумарної кількості колагену з переважанням НК у легенях – в 1,4 раза, у шкірі – в 1,3 раза. У цей період зміни індивідуальних ГАГ характеризувалися у легенях – збільшенням хондроїтинсульфату А і С в 1,7 раза, у шкірі – дерматансульфату в 1,6 раза та в обох органах – гепарансульфату в 1,7 раза.

Висновки. Встановлені радіаційно-індуковані зміни у сполучнотканинному матриксі органів щурів за своєю спрямованістю не залежали від дози рентгенівського випромінювання, носили органоспецифічний характер та визначалися часом після опромінення.

Ключові слова: рентгенівське випромінювання, легені, шкіра, сполучнотканинний матрикс, щури.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 471–481.

N. E. Uzlenkova✉

State Institution “S.P. Grigoriev Institute for Medical Radiology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Pushkins'ka str, 82, Kharkiv, 61024, Ukraine

Radiation, induced changes in connective tissue matrix of rat organs at total body X-ray exposure

Objective. To study the nature of radiation-induced changes in the connective tissue matrix of rats under single total body X-ray exposure in minimal lethal and sublethal doses.

Materials and methods. Experiments conducted on white male rats weighing 160–180 g, which were exposed to the influence of X-radiation doses LD_{15/30} and LD_{60/30} at the installation RUM-17 in standard specifications. Assessment of connective tissue matrix was performed by the total content of collagen, soluble (SC) and insoluble (ISC) collagen, collagen destruction rate by free hydroxyproline, collagenolytic activity (CLA), individual glycosaminoglycans (GAG). Experiments were performed on days 3, 7 and 14 and 30th, 90th and 180th days. The age control was used to each term of experiments. Statistical analysis of data was performed using Wilcoxon-Mann-Whitney criterion and Student's t-test using packet Biostatistics v.4.03 for Windows.

✉ Узленкова Наталя Євгенівна, e-mail: imr@mail.ru

Results. The changes of collagen (3–7 days) were characterized by violation of ratio SC and ISC, accelerated disintegration of collagen by free hydroxyproline in the lungs – 1.7 times, the skin – 1.2 times, rising of metal-dependent CLA in the lungs – 2.0 times and metal-independent CLA in the skin – 2.2 times, an increase of hyaluronic acid in the lungs – 1.7 times, in the skin – 1.5 times. At the late period (180 days) an increase of the total content of collagen was determined with a 1.4 times predominance of IC in the lungs and 1.3 times in the skin. During this period changes of individual GAG were characterized by – 1.7 times increase of chondroitin sulfate A and C in the lungs, 1.6 times dermatan sulfate in the skin and 1.7 times heparan sulfate in both organs.

Conclusion. Revealed radiation-induced changes in the connective tissue matrix of rats in their direction were not dependent on the dose of X-rays, were organ-specific and determined by time after exposure.

Key words: external X-ray irradiation, lung, skin, connective tissue matrix, rats.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:471-481.

Умовні скорочення

СКК – сумарна кількість колагену
 РК – розчинний колаген
 НК – нерозчинний колаген
 ГАГ – глікозаміноглікани
 сГАГ – сульфатовані глікозаміноглікани
 КЛА – колагенолітична активність
 ГУК – гіалуронова кислота
 ХС_{А,С} – хондроїтинсульфат А і С
 ХС_В – хондроїтинсульфат В (дерматансульфат)
 ГПС – гепарансульфат

Abbreviations

TAC – total amount of collagen
 SC – soluble collagen
 ISC – insoluble collagen
 GAG – total glycosaminoglycans
 sGAG – sulphated glycosaminoglycans
 CLA – collagenolytic activity
 HUA – hyaluronic acid
 CS_{A,C} – chondroitin sulphate A and C
 CS_B – chondroitin sulphate B (dermatansulphate)
 HPS – heparansulphate

ВСТУП

На цей час не викликає сумніву значна роль сполучної тканини в адаптації організму до змін у навколишньому середовищі, зокрема, до дії радіаційного фактору. Згідно до сучасних уявлень, основні компоненти сполучнотканинного матриксу формують мікрооточення клітин будь якого типу, безпосередньо беруть участь у процесах морфогенезу, цитодиференціюванні, руху клітин, а також забезпечують механічну міцність усіх органів [1]. Відомо, що зміни у складі сполучної тканини супроводжують мало не кожен патологічний процес [2–4]. Взаємодія біополімерів сполучнотканинного матриксу з поверхневими рецепторами у клітині змінює мембранний потенціал та за цим опосередковано впливає на спрямованість метаболічних процесів у клітині [5, 6].

Незважаючи на це, про радіаційні зміни компонентів сполучнотканинного матриксу повідомляється лише в окремих працях, в основному присвячених впливу іонізуючого випромінювання у радіотерапевтичних дозах [7–10]. Практично відсутні дані щодо дії рентгенівського випромінювання у значних дозах, але дослідження у цьому напрямку залишаються актуальними.

МЕТА

Вивчити характер радіаційно-індукованих змін у сполучнотканинному матриксі органів щурів за умов одноразової дії рентгенівського опромінення у мінімально летальній та сублетальній дозах.

INTRODUCTION

Currently it is undoubtedly established that connective tissue plays a significant role in adaptation of the body to environmental changes, in particular to radiation factor. According to current concepts, the main components of connective tissue matrix form microenvironment of the cells of any type, directly take part in the processes of morphogenesis, cytodifferentiation, cellular motion, and provide mechanical hardness of all organs [1]. It is known that changes in connective tissue composition accompany almost all pathological processes [2–4]. Interaction of connective tissue biopolymers with superficial receptors in cell changes the membrane potential and consequently influences mediately on cellular metabolic processes orientation [5, 6].

In spite of this, the radiation changes of connective tissue matrix are reported in several works, mainly on ionizing radiation in radiotherapeutic doses [7–10]. Practically, there are no available data concerning X-ray irradiation in considerable doses, and such research is thus of certain topicality.

OBJECTIVE

To study the character of radiation-induced changes in connective tissue matrix of rat organs after single exposure to total X-ray irradiation in minimal lethal and sublethal doses.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводилися на білих щурах-самцях масою 160-180 г, яких утримували за стандартними умовами на звичайному раціоні виварію. Використовували експериментальну модель одноразового впливу рентгенівського випромінювання у дозах $LD_{15/30}$ і $LD_{60/30}$. Тварин опромінювали на установці РУМ-17 за стандартних технічних умов: напруга – 200 кВ, сила струму – 10 мА, фільтр – 0,5 мм Cu + 1 мм Al, тубус F-40, потужність дози 0,554 Гр/хв, $E_{ef} = 80,3$ кеВ. Поглинуті дози по м'яких тканинах складали 4,0 і 6,2 Гр. Тварин контрольної групи піддавали псевдоопроміненню. При виконанні дослідів дотримувались рекомендацій щодо медико-біологічних досліджень згідно з міжнародними принципами Європейської конвенції “Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей” (Страсбург, 1998) та норм біомедицинської етики, відповідно до Закону України “Про захист від жорстокого поводження” (Київ, 2006) під контролем комітету з медичної етики ДУ “Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України”. Тварин було розподілено на відповідні контрольну і піддослідні групи (по 10-15 тварин). Досліди проводили на 3, 7 і 14-ту добу та на 30, 90 і 180-ту добу (1, 3 і 6 міс) після опромінення. Контрольну групу тварин використовували на кожен термін досліджень, оскільки це дало можливість врахувати вікові зміни в умовах тривалого експерименту.

Про зміни компонентів сполучнотканинного матриксу у легенях і шкірі щурів судили за визначенням сумарної кількості колагену (СКК), співвідношенням фракцій I і II розчинного (РК) і нерозчинного (НК) колагену, швидкістю руйнування колагену при проведенні прямого 2- та 6-годинного кислотного гідролізу у розчині хлористо-водневої кислоти в молярній концентрації 6 моль/л, кількості сумарних і сульфатованих глікозаміногліканів (ГАГ і сГАГ) та їх індивідуальних фракцій [11]. Фракцію I РК екстрагували розчином NaCl (2 моль/л) на фосфатному буфері з молярною концентрацією 0,04 моль/л, pH = 7,4 з 0,04 % Твін 20 (PBS-Tween 20) та фракцію II – цитратним буфером з молярною концентрацією 0,35 моль/л, pH = 4,3. Для одержання НК проводили гідроліз тканин трипсином (100 мг ТРСК, Worthington Biochemicals, США). Кількісне визначення колагену проводили по реакції гідроксипроліну з хлораміном Т за методом [12]. Як стандарт використовували гідроксипролін фірми Reanal (Венгрія). Для вивчення інтенсивності обміну кола-

MATERIAL AND METHODS

White male rats weighing 160-180 g were kept under standard conditions and standard vivarium diet. Experimental model of single total X-ray irradiation in the doses of $LD_{15/30}$ and $LD_{60/30}$ was used. The animals were irradiated at RUM-17 device under standard technical conditions: voltage – 200 kV, amperage – 10 mA, filter – 0.5 mm Cu + 1 mm Al, tubule F-40, dose rate 0.554 Gy/min, $E_{ef} = 80.3$ keV. Absorbed doses for soft tissues were of 4.0 Gy and 6.2 Gy. Control animals were pseudo-irradiated. At fulfilment of the experiments we followed the recommendations for medical biological research according to the international principles of “European Convention For the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1998) and norms of biomedical ethics according to the Law of Ukraine “On protection against the rude treatment” (Kyiv, 2006) under the control of the Committee for Medical Ethics of State Institution “Grigoriev Institute for Medical Radiology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine”. The animals were divided into control and experimental groups (each of 10–15 animals). The experiments were carried out at days 3, 7, 14 and at days 30, 90, 180 (1, 3 and 6 months) after irradiation. The control group of animals was used for every term of experiments since it gave possibility to consider age changes under conditions of continuous experiment.

The changes of connective tissue matrix components in rat lungs and skin were evaluated on the estimated total amount of collagen (TAC), ratio of fractions I and II of soluble (SC) and insoluble (ISC) collagen, collagen destruction rate at direct 2- and 6-hour acid hydrolysis in solution of hydrochloric acid in concentration of 6 mol/L, quantity of total and sulphated glycosaminoglycans (GAG and sGAG) and their individual fractions [11]. Fraction I SC was extracted with NaCl (2 mol/L) phosphate buffered solution with concentration of 0.04 mol/L, pH = 7.4 with 0.04 % PBS-Tween 20 and fraction II – with citrate buffer, concentration of 0.35 mol/L, pH = 4.3. The tissues were hydrolysed with trypsin (100 mg ТРСК, Worthington Biochemicals, USA) to get ISC. Quantitative determination of collagen was realized according to the reaction of hydroxyproline with chloramine T by method [12]. We used Reanal hydroxyproline (Hungary) as a standard. To study intensity of collagen metabolism, the

гену оцінювали концентрацію вільної фракції гідроксипроліну, а також колагенолітичну (металозалежну та металонезалежну) активність (КЛА). Виділення ГАГ проводили за гідролізом колагеназою *Clostridium Histoliticum* (600 од.) і осаджували розчином 2 % хлориду цетилпіридинію. Фракціонування ГАГ проводили за іонообмінною хроматографією на Dowex 1 × 2 із наступним кількісним аналізом індивідуальних ГАГ за концентрацією D-глюкуронової і L-ідурунової кислот [13]. Як стандарт використовували γ -лактон-D-глюкуронової кислоти та L-ідурунову кислоту фірми Merck. Отримані дані обробляли статистично за допомогою пакета Biostatistics v.4.03 для Windows з використанням непараметричного критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні, а також *t*-критерію Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Швидкість гідролізу колагену (рис. 1), безпосередньо у гострий період, на 3-ю і 7-му добу, відзначалася істотним підвищенням у легенях – в 1,8 і 2,2 рази, у шкірі – в 1,2 і в 1,3 рази. Вміст вільного гідроксипроліну, як метаболіту сполучнотканинного походження, вірогідно зростав у легенях при обох дозах опромінення в середньому в 1,7 рази та у шкірі – в 1,2 рази відносно контролю. Разом з цим, кількісний рівень фракції I РК у легенях зростав пропорційно дозі опромінення в 1,7 і в 1,9 рази, фракції II РК у шкірі – в 1,4 і 1,6 рази.

Водночас, на 3-ю добу металозалежна КЛА у легенях перевищувала контрольний рівень в 1,5 і в 2,0 рази, а на 7-му добу – в 1,3 і 1,6 рази, тоді як у шкірі зміни металозалежної КЛА були менш виражені, ніж у легенях (рис. 2). Навпаки, на 3-ю добу металонезалежна КЛА у шкірі зростала відповідно дозі опромінення в 1,3 і в 1,7 рази, на 7-му добу – в 1,4 і в 2,2 рази, а на 14-ту добу залишалася підвищеною майже у 2,0 рази при дозі 6,2 Гр. У наступні терміни, починаючи з 30-ї доби, активність обох колагенолітичних систем у легенях і шкірі помітно знижувалася та реєструвалася практично на рівні контрольних величин. Також, у віддалені строки спостерігалася вірогідне зростання СКК з переважним накопиченням фракції НК, яка на 180-ту добу відзначалася збільшеною у легенях – в 1,3 і в 1,4 рази та у шкірі – в 1,2 і 1,3 рази відносно контролю.

Як свідчать дані, приведені на рис. 3, на 3-ю і 7-му добу зміни у фракційному складі ГАГ характеризувалися зростанням фракції гіалуронової кислоти (ГУК) у легенях – в 1,4 і в 1,7 рази, у шкірі – в 1,4 і в 1,5 рази.

hydroxyproline free fraction concentration as well as collagenolytic (metal-dependent and metal-independent) activity (CLA) were estimated. GAGs separation was carried out at hydrolysis with 2% solution of collagenase *Clostridium Histoliticum* (600 U) and sedimented with Cetylpyridinium Chloride (CPC). GAGs fractionation was carried out with ionic exchange chromatography at Dowex 1 × 2 followed by quantitative analysis of individual GAGs according to concentrations of D-gluconic acid γ -lactone and L-iduronic acids [13]. Merck D-glucuronic acid gamma-lactone was used as a standard. The obtained data were processed statistically using Biostatistics v.4.03 for Windows with Mann-Whitney-Wilcoxon non-parametric estimate and Student's *t*-test.

RESULTS AND DISCUSSION

The data given in Figure 1 show evidence that in acute period at day 3 and 7, collagen hydrolysis rate was significantly 1.8 and 2.2 times higher in lungs and 1.2 and 1.3 times in skin, and contents of free hydroxyproline as a metabolite of connective tissue origin grew reliably at both doses of irradiation, in average 1.7 times in lungs and 1.2 times in skin compared to the control. Meanwhile, quantitative level of SC fraction I in lungs grew in proportion to the irradiation dose 1.7 and 1.9 times and SC fraction II in skin – 1.4 and 1.6 times.

At the same time, at day 3 metal-dependent CLA in lungs was 1.5 and 2.0 times increased, and at day 7 it showed 1.3 and 1.6 times growth, meanwhile, in skin the changes of metal-dependent CLA were less manifested than in lungs (Figure 2). On the contrary, at day 3 demonstrated 1.3 and 1.7 times growth of metal-independent CLA in skin accordingly to the radiation dose, at day 7 – 1.4 and 2.2 times, correspondingly, and at day 14 it remained almost 2.0 times increased at the dose of 6.2 Gy. Within next terms, since day 30, activity of both collagenolytic systems in lungs and skin reduced noticeably and was actually registered at control levels. The long-term evaluation showed valid growth of TAC with prevailing accumulation of ISC fraction which at day 180 was registered as 1.3 and 1.4 times increased value in lungs and 1.2 and 1.3 times in skin vs. controls.

Figure 3 gives the evidence of the days' 3 and 7 changes in GAGs fractional composition which are characterized by 1.4 and 1.7 times increase of hyaluronic acid (HUA) fraction in lungs and 1.4 and 1.5 times in skin.

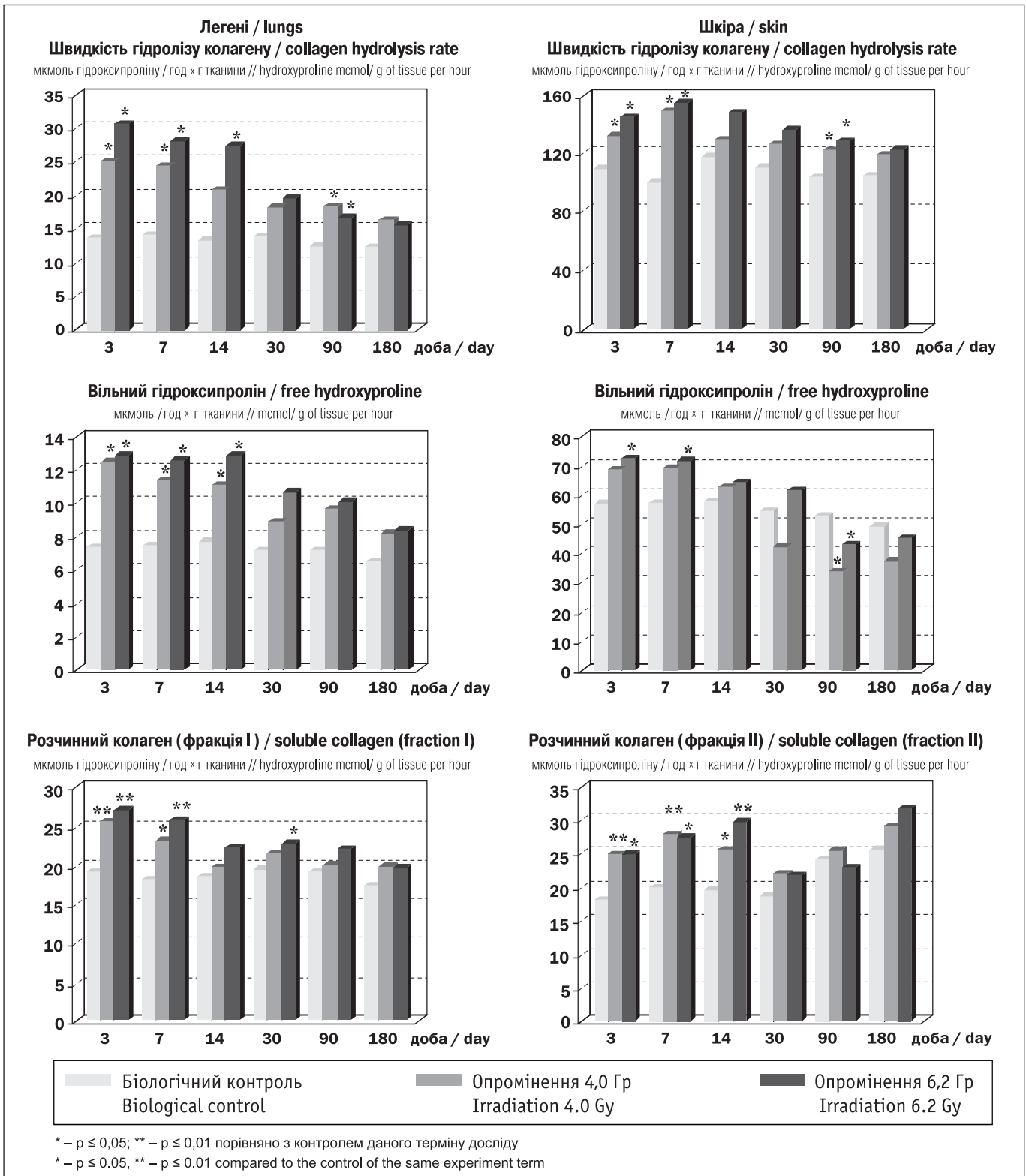


Рисунок 1. Показники інтенсивності метаболізму колагену у сполучнотканинному матриці органів щурів за одноразового загального зовнішнього рентгенівського опромінення у різних дозах

Figure 1. Parameters of collagen metabolism intensity in connective tissue matrix of rat organs after exposure to single total X-ray irradiation in various doses

При цьому у віддалені терміни спостережень збільшення кількості сульфатованих ГАГ (сГАГ) призвело до вибіркового зростання фракції хондроїтин-сульфату А і С ($XC_{A,C}$) у легенях на 90-ту добу – в 1,5

At the same time, in long-term observation the increased number of sulphated GAGs (sGAGs) caused selective 1.5 and 1.7 times increase of A and C chondroitin sulphate fraction ($CS_{A,C}$) in lungs at

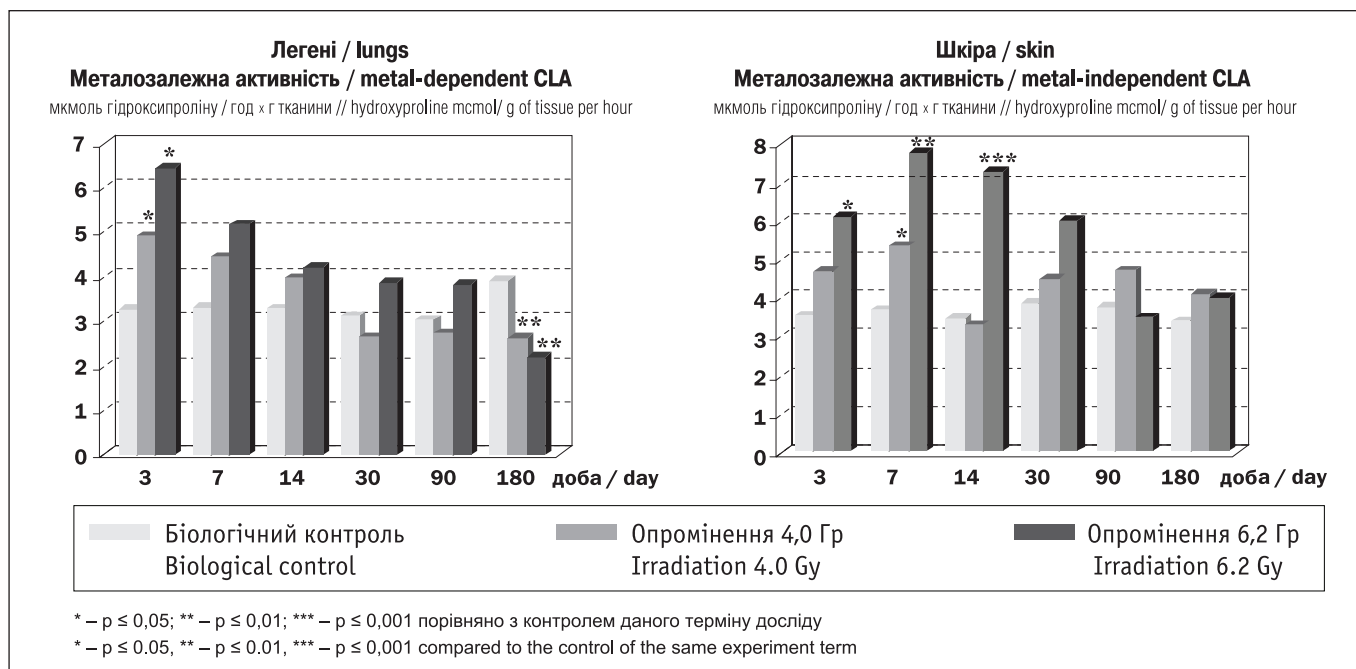


Рисунок 2. Металозалежна та металонезалежна КЛА у сполучнотканинному матриксі органів щурів за одноразового загального зовнішнього рентгенівського опромінення у різних дозах

Figure 2. Metal-dependent and metal-independent CLA in connective tissue matrix of rat organs after exposure to single total X-ray irradiation in various doses

і в 1,7 раза, на 180-ту добу – в 1,6 і в 1,7 раза та специфічного для шкірі зростання фракції дерматансульфату (ХС_В) на 90-ту добу – відповідно в 1,4 і в 1,5 раза, на 180-ту добу – в 1,5 і в 1,6 раза, а також накопичення фракції гепарансульфату (ГПС) на 90-ту добу у легенях – в 1,3 і в 1,5 раза та у шкірі – в 1,4 і в 1,5 раза, на 180-ту добу – відповідно в 1,4 і 1,6 раза та у 1,4 і 1,7 раза.

Отже, проведені дослідження дозволили охарактеризувати характер змін з боку основних компонентів сполучнотканинного матриксу у легенях і шкірі щурів внаслідок одноразової дії загального рентгенівського випромінювання у мінімально летальній та сублетальній дозах. Було доведено, що радіаційно-індуковані зміни за своєю спрямованістю були однаковими при обох дозах рентгенівського випромінювання, за своїм характером відрізнялися залежно від часу, що минув після опромінення та мали деяку органну специфічність.

Одержані результати показали, що безпосередньо у гострий період після опромінення, з 3-ї по 14-ту добу, загальна величина СКК не зазнавала суттєвих змін, але відбувалися порушення складу колагену та зміни у кількісному співвідношенні фракцій РК і НК у сполучній тканині органів щурів. Характерною ранньою реакцією на опромінення було підвищення рівню метаболітів сполучнотканинного походження та максимальне зростання вмісту РК відповідно фракції I – у легенях та фракції II – у

day 90 and 1.6 and 1.7 times at day 180, and specifically for skin 1.4 and 1.5 time growth of dermatansulphate fraction (CS_B) at day 90 correspondingly, and 1.5 and 1.6 times at day 180, and heparansulphate (HPS) fraction accumulation at day 90 in lungs – 1.3 and 1.5 times, and in skin – 1.4 and 1.5 times, and at day 180, correspondingly – 1.4 and 1.6 times and 1.4 and 1.7 times.

Thus, the carried experiments allowed to characterize the changes of the main components of connective tissue matrix in rat lungs and skin at single effect of total X-ray irradiation in minimal lethal and sublethal doses. It was proved that radiation-induced changes in tendency were equal at both doses of X-irradiation, but in character were different as for time after irradiation and demonstrated certain organ specificity.

The obtained results showed that just in post-irradiation acute period from days 3 to 14, the total values of TCA were not affected essentially, but the disorders in collagen contents and changes in quantitative ratio of SC and ISC fractions in connective tissue of rat organs were registered. Increase of the level of metabolites which were connective tissue originally, and maximal growth of SC, correspondingly to fraction I – in lungs and fraction II – in skin were the characteristic early

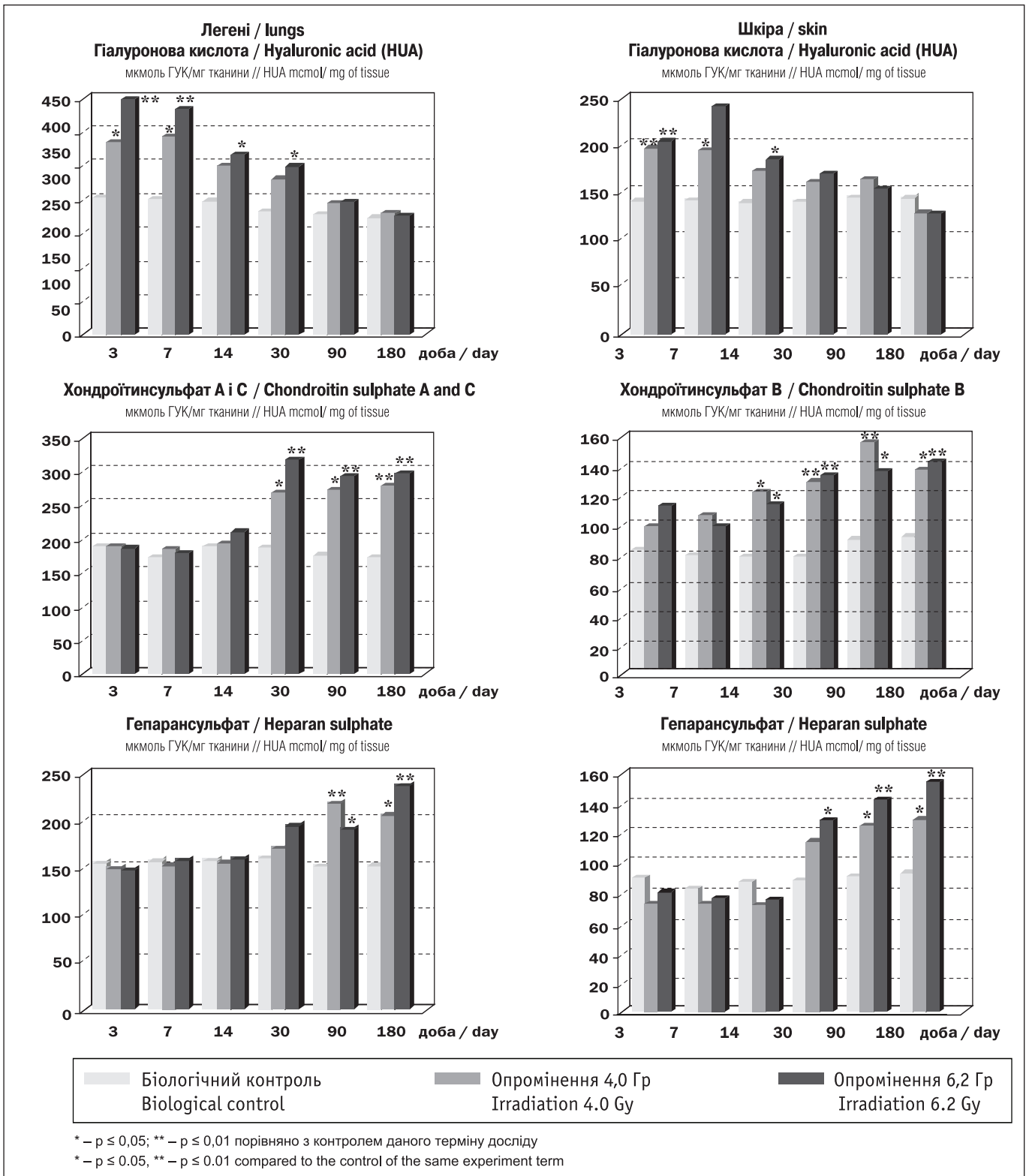


Рисунок 3. Фракційний склад ГАГ у сполучнотканинному матриці органів щурів за одноразового загального зовнішнього рентгенівського опромінення у різних дозах

Figure 3. Fraction composition of GAGs in in connective tissue matrix of rat organs after exposure to single total X-ray irradiation in various doses

шкірі. Відомо, що фракція I РК найбільш легко екстрагується з тканини й може перетворюватися у НК без стадії кислоторозчинності, тоді як фракція II РК екстрагується розчинами зі зниженою іонною

response to irradiation. It is known that the easiest way to extract SC fraction I is from tissue and it may turn into ISC missing the acid solubility stage, whereas SC fraction II is extracted by solutions

силою та має надмірну кількість інтрамолекулярних зв'язків. Незважаючи на виявлені відмінності, кількісні зміни фракцій РК у легенях і шкірі у ранні строки були пов'язані з підвищенням інтенсивності ферментативного розпаду колагену у сполучній тканині. Про це свідчили зміни активності ферментних систем, зокрема, металозалежної та металонезалежної КЛА, що функціонують у сполучній тканині та беруть участь у процесах руйнування колагенових білків. Встановлена органоспецифічність, зокрема, у шкірі пояснюється тим, що у ній більш високу активність мають металонезалежні протеїназні системи [14].

На відміну від раннього періоду, починаючи з 30-ї доби та у наступні 90-ту і 180-ту добу (3 і 6 міс) після опромінення темпи розпаду колагену істотно знижувалися та реєструвалося зростання СКК у легенях і шкірі опромінених тварин. Найбільш характерним для віддаленого періоду було переважне накопичення нерозчинних комплексів колагену у складі СКК та прискорення процесів утворення НК у сполучнотканинному матриксі.

За результатами проведених досліджень було встановлено, що загальне зовнішнє рентгенівське опромінення у досліджених дозах викликало суттєві зміни концентрації сумарних ГАГ та їх індивідуальних фракцій сГАГ у сполучній тканині. Відомо, що біополімери ГАГ утворюють надмолекулярні нековалентні комплекси з колагеновими білками, регулюють процеси дозрівання молекул колагену та являються важливою характеристикою сполучнотканинного матриксу [15]. Встановлені радіаційно-індуковані зміни цієї компоненти сполучнотканинного матриксу характеризувалися збільшенням сумарного рівня ГАГ, що на ранньому етапі безпосередньо пов'язувалося з істотним зростанням фракції ГУК у легенях і шкірі. Відповідно, на пізньому етапі встановлені зміни з боку індивідуальних сГАГ мали органоспецифічний характер й відзначалися вибіркоvim накопиченням фракції ХС_{A,C} у легенях, фракції дерматансульфату (ХС_B) у шкірі та фракції ГПС у сполучній тканині обох органів. Таким чином, за результатами дослідів було доведено, що радіаційно-індуковані зміни реєструвалися протягом тривалого часу після опромінення і характеризувалися підвищенням інтенсивності метаболізму основних компонентів сполучнотканинного матриксу. Зважаючи на особливу роль колагенових структур та кожного з окремих типів ГАГ у забезпеченні структурного і функціонального стану сполучної тканини, можна припустити, що встановлені

with decreased ionic strength and has excessive quantity of intramolecular bonds. In spite of the revealed differences, quantitative changes of SC fractions in lungs and skin at early terms were connected with increased intensity of enzymatic destruction of collagen in connective tissue. It was proved by the changed activity of enzyme systems, in particular, metal-dependent and metal-independent CLA participating in destruction of collagen proteins. The revealed organ specificity, in particular, in skin may be explained by the higher activity of metal-independent proteinase systems in it [14].

On the contrary from the early period, starting from day 30, in following 90 and 180 days (3 and 6 months) after irradiation the rate of TOA destruction reduced significantly and we registered TOA increase in lungs and skin of irradiated animals. Predominant accumulation of collagen insoluble complexes in TOA composition and acceleration of the processes of ISC formation in connective tissue matrix were the most characteristic in remote period.

According to the carried research it has been established that total X-irradiation in the investigated doses induced significant changes in concentration of total GAGs and their individual fractions sGAGs in connective tissue. It is known that GAGs biopolymers form supermolecular non-covalent complexes with collagenous proteins, regulate processes of maturation of collagen molecules and are important feature of connective tissue matrix [15]. The revealed radiation-induced changes of this component of connective tissue matrix are characterized by increased total level of GAGs, that at the early stage was directly connected with significant growth of HUA in lungs and skin. Correspondingly, at the late stage the revealed changes in individual sGAGs were organ specific and showed selective accumulation of CS_{A,C} fraction in lungs, dermatansulphate fraction (CS_B) in skin and HPS fraction in connective tissue of both organs. Thus, according to the results of experiments it was proved that radiation-induced changes were registered within prolonged time after irradiation and were characterized by increased metabolism intensity of the main components of connective tissue matrix. Considering the particular role of collagenous structures and each of specific types of GAGs in realizing structural and functional condition in connective tissue, it is possible to suggest that the revealed

зміни лежать в основі формування радіаційно-індукованих ускладнень, які визначаються з боку життєво важливих органів у віддалені терміни після опромінення. Так, накопичення сГАГ, зокрема $CS_{A,C}$ та ГПС, служить специфічним мітогенним стимулом для клітин, які синтезують компоненти сполучнотканинного матриксу [16]. Встановлено за результатами дослідів прогресуюче підвищення СКК та сГАГ і порушення їх кількісних співвідношень у сполучнотканинному матриксі узгоджувалося з даними попередніх досліджень щодо підвищення частоти розвитку радіаційно-індукованих пневмофіброзів на віддалених етапах після опромінення. Як було доведено [17], у легенях опромінених щурів через 3 і 6 місяців спостережень визначалися осередкові ушкодження паренхіматозних структур і неспецифічні проліферативні розростання сполучнотканинного матриксу. На нашу думку, виявлені порушення кількісних співвідношень і фракційного складу колагену і ГАГ безумовно впливають на функціональні властивості сполучнотканинного матриксу та виникають як прояви тривалих системних змін у сполучній тканині при формуванні її радіаційної відповіді. Таким чином, за практичною значимістю проведені дослідження вказують на особливу роль сполучної тканини у патогенетичних механізмах розвитку віддаленої радіаційної патології внаслідок дії на організм іонізуючого рентгенівського випромінювання.

ВИСНОВКИ

1. Радіаційно-індуковані зміни у сполучнотканинному матриксі органів щурів за одноразової дії загального рентгенівського опромінення у мінімально летальній та сублетальній дозах за своєю спрямованістю були однаковими при обох дозах, мали органоспецифічний характер та визначалися часом після опромінення.
2. Встановлено, що в основі радіаційно-індукованих порушень у сполучнотканинному матриксі на ранніх етапах після опромінення лежать зміни активності металозалежної та металонезалежної КЛА, підвищення вмісту РК фракції I – у легенях та фракції II – у шкірі та на віддалених етапах – максимальне зростання СКК і НК.
3. Встановлені зміни у фракційному складі ГАГ на ранніх етапах проявляються зростанням кількості ГУК та на віддалених етапах – накопиченням фракції $CS_{A,C}$ у легенях, фракції дерматансульфату (CS_B) у шкірі та фракції ГПС у сполучній тканині обох органів.

changes are basic for the formation of radiation-induced complications which are determined by vital organs in long-term period after irradiation. Thus, GAGs accumulation, in particular $CS_{A,C}$ and HPS, serves as a specific mutagenic stimulation for cells synthesizing components of connective tissue matrix [16]. Progressive rising of TAC and sGAGs and their disordered quantitative correlations in connective tissue matrix revealed on the basis of the results of experiments coordinate with the data of the previous research about the increased frequency of the development of radiation-induced pneumofibroses at post-irradiation long-term stages. As it was proved in [17], the focal lesions of parenchymal structures and non-specific proliferative overgrowth of connective tissue matrix were identified at 3 and 6 months of observations in lungs of irradiated rats. To our opinion, the revealed disorders of quantitative correlations and fraction composition of collagen and GAGs undoubtedly influence on functional properties of connective tissue matrix and develop as manifestation of continuous systemic changes in connective tissue while formation its radiation response. Thus, practical value of the carried research indicates specific role of connective tissue in pathogenetic mechanisms of the development of long-term radiation pathology due to the ionizing X-ray irradiation effect on the body.

CONCLUSIONS

1. Radiation-induced changes in connective tissue matrix of rat organs at single effect of total x-ray irradiation in minimal lethal and sublethal doses were equal in tendency at both doses, demonstrated organ specific character and were determined by post-irradiation time.
2. Radiation-induced disorders in connective tissue matrix at early post-irradiation stages are grounded on the changes of metal-dependent and metal-independent CLA activity, increase of SC fraction I content in lungs and fraction II in skin and maximal growth of TAC and ISC at long-term stages.
3. The revealed changes in GAGs fraction composition at early stages are manifested by increased HUA value and at long-term stages by accumulation of $CS_{A,C}$ fraction in lungs, dermatansulphate fraction (CS_B) in skin and HPS fraction in connective tissue of both organs.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Jozzo R. V. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function / R. V. Jozzo // *Annu. Rev. Biochem.* – 2008. – Vol. 67. – P. 609-652.
2. Бондаренко Л. Б. Структура и обмен коллагенов при различных патологиях / Л. Б. Бондаренко // *Укр. біохім. журнал.* – 1998. – Т. 70, № 3. – С. 12–23.
3. Antifibrillar autoantibodies present in systemic sclerosis and other connective tissue diseases interact with similar epitopes / K. Kasturi, A. Hatayama, H. Spriera, C. Bona // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 181. – P. 1027–1036.
4. Okano J. Autoantibody to U3 nucleolar ribonucleoprotein (fibrillarin) in patients with systemic sclerosis / J. Okano, V. D. Steen, I. A. Medsger // *Arthritis Rheum.* – 2002. – Vol. 35. – P. 95–100.
5. Koide T. Substrate recognition of collagen-specific molecular chaperone HSP47. Structural requirements and binding regulation / T. Koide, S. Asada, K. Nagata // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 274. – No. 34 – P. 523–34.
6. Ionizing radiation modulates cell surface integrin expression adhesion of COLO-320 cell to collagen and fibronectin in vivo / V. Mienke, K. Gilbert, K. Schilperoot [et al.] // *Stahlether Oncol.* – 2002. – Vol. 178, No. 12. – P. 709–714.
7. Juliano R. L. Increased expression of collagen types I and II in human skin as a consequence of radiotherapy / R. L. Juliano, S. Hasskill // *Arch. Dermatol. Res.* – 2005. – Vol. 294. – P. 178–184.
8. Type I collagen turnover and cross-linking are increased in irradiation skin of breast cancer patients / M.-L. Sassi, A. Jukkola, R. Rieki [et al.] // *Radiother Oncol.* – 2001. – Vol. 58. – P. 317–323.
9. Modulation of skin collagen metabolism by irradiation: collagen synthesis is increased in irradiated human skin / R. Rieki, A. Jukkola, M.L. Sassi [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2000. – Vol. 142. – P. 874–880.
10. The expression pattern of collagen I in irradiation mandibula salivary glands of rats / R. E. Friedrich, S. Bartel-Friedrich, K. Roser [et al.] // *Anticancer Res.* – 2003. – Vol. 23, № 2A. – P. 927–930.
11. Шараев П. Н. Модифицированные методы исследования показателей обмена веществ соединительной ткани : метод. реком. / П. Н. Шараев. – Ижевск : [б. и.]. – 1980. – 16 с.
12. Замараева Т. В. Методы определения содержания коллагеновых белков по оксипролину / Т. В. Замараева // *Современные методы в биохимии: сб. статей – М. : Медицина.* – 1997. – С. 262–264.
13. Узленкова Н. Є. Фракційний склад глікозаміногліканів у органах щурів за умов одноразової дії зовнішнього ікс-опромінення / Н. Є. Узленкова // *Укр. радіол. журн.* – 2010. – Т. XVIII, вип. 1. – С. 83–88.
14. Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2) collagenase (MMP-1) and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis / C. Lafuta, E. Nabout Azzi, F. Crechet [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2004. – Vol. 102, № 6. – P. 945–951.
15. Modulation of sulfated glycosaminoglycan and small proteoglycan synthesis by extracellular matrix / J. Wegrovski, P. Gillery, C. Kotlars [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2000. – Vol. 205. – P. 125–131.

REFERENCES

1. Jozzo RV. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 2008;67:609-52.
2. Bondarenko LB. [Structure and exchange of collagens at different pathologies]. *Ukr Biokhim Zh.* 1998 Mar;70(3):12-23. Ukrainian.
3. Kasturi K, Hatayama A, Spriera H, Bona C. Antifibrillar autoantibodies present in systemic sclerosis and other connective tissue diseases interact with similar epitopes. *J Exp Med.* 2005;181:1027-36.
4. Okano J, Steen VD, Medsger IA. Autoantibody to U3 nucleolar ribonucleoprotein (fibrillarin) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2002;35:95-100.
5. Koide T, Asada S, Nagata K. Substrate recognition of collagen-specific molecular chaperone HSP47. Structural requirements and binding regulation. *J Biol Chem.* 2003;274:34.523-26.
6. Mienke V, Gilbert K, Schilperoot K. Ionizing radiation modulates cell surface integrin expression adhesion of COLO-320 cell to collagen and fibronectin in vivo. *Stahlether Oncol.* 2002 Dec;178(12):709-14.
7. Juliano RL, Hasskill S. Increased expression of collagen types I and II in human skin as a consequence of radiotherapy. *Arch Dermatol Res.* 2005;294:178-84.
8. Sassi M-L, Jukkola A, Rieki R. Type I collagen turnover and cross-linking are increased in irradiation skin of breast cancer patients. *Radiother Oncol.* 2001;58:317-23.
9. Rieki R, Jukkola A, Sassi ML. Modulation of skin collagen metabolism by irradiation: collagen synthesis is increased in irradiated human skin. *Br J Dermatol.* 2000;142:874-80.
10. Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Roser K. The expression pattern of collagen I in irradiation mandibula salivary glands of rats. *Anticancer Res.* 2003;23(2A):927-30.
11. Sharaev PN. [Modified methods of research of indexes of exchange of matters of connecting fabric]. *Izhevsk;* 1980.182 p. Russian.
12. Zamaraeva TV. [Methods of determination of maintenance of collagen albumens on oxiprolin]. *Sovremennye metody v biokhimii: sbornik statey;* 1997. p. 262-4. Russian.
13. Uzenkova NY. [Faction composition of glycosaminoglycans in the organs of rats at the terms of non-permanent action external x-irradiation]. *Ukr. radiol. zhurnal.* 2010 Jan-Mar;18(1): 83-8. Ukrainian.
14. Lafuta C, Nabout Azzi E, Crechet F. Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2) collagenase (MMP-1) and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol.* 2004 Jun;102(6):945-51.
15. Wegrovski J, Gillery P, Kotlars C. Modulation of sulfated glycosaminoglycan and small proteoglycan synthesis by extracellular matrix. *Mol Cell Biochem.* 2000;205:125-31.

16. Verlag G. F. Glycosaminoglycan and collagen fibrillar interactions in the mouse corneal stroma / G. F. Verlag // Matrix Biology. – 1994. – Vol. 14. – P. 283–286.

17. Динаміка експериментальних пневмофіброзів у щурів під впливом рентгенівського випромінювання / Н. Є. Узленкова, Є. М. Мамотюк, О. К. Кононенко, В. А. Гусакова // УРЖ. – 2007. – № 1. – С. 523–528.

16. Verlag GF. Glycosaminoglycan and collagen fibrillar interactions in the mouse corneal stroma. Matrix Biology. 1994;14:283-86.

17. Uzlenkova NY, Mamotiuk YM, Kononenko OK, Gusakova VA. [Rats have a dynamics of experimental пневмофіброзів under act of x-ray photography radiation]. Ukrains'kyi radiolohichnyi zhurnal. 2007;15(1):523-28. Ukrainian.

Стаття надійшла до редакції 7.07.2014

Received: 7.07.2014