



## UČINAK OZRAČIVANJA KOKOŠJIH JAJA MALOM DOZOM GAMA ZRAČENJA SEDMOGA DANA INKUBACIJE NA AKTIVNOST FOSFATAZA U KRVNOJ PLAZMI IZLEŽENIH PILIĆA

Petar Kraljević<sup>1</sup>, Marinko Vilić<sup>1</sup>, Saveta Miljanić<sup>2</sup> i Miljenko Šimpraga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zavod za fiziologiju i radiobiologiju, Veterinarski fakultet  
Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb

<sup>2</sup>Institut "Ruđer Bošković", Bijenička 54, 10000 Zagreb  
e-mail: kraljev@vef.hr

### UVOD

Naši raniji rezultati [1,2] pokazali su da je rast pilića izleženih iz jaja ozračenih gama zračenjem dozom od 0,15 Gy prije inkubacije značajno veći tijekom tova nego u pilića koji su izleženi iz neozračenih jaja. Osim toga, aktivnost aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT), kisele fosfataze (ACP) i glukoze u krvnoj plazmi tih pilića bila je veća nego u kontrolne skupine pilića. Ovi su rezultati, prema tome, potvrdili rezultate Todorova i Dijanovskog [3] da male doze gama zračenja mogu stimulirati neke metaboličke procese u peradi izleženih iz jaja ozračenih prije inkubacije. Istražujući ozračivanje pilećih embrija dozom od 0,15 Gy gama zračenja sedmoga dana inkubacije, tj. u vrijeme kada je organogeneza dovršena, na aktivnost transferaza u krvnoj plazmi pilića izleženih iz tih jaja, zabilježili smo porast aktivnosti AST i ALT 10. dana pokusa (tova), a pad njihove aktivnosti 20. dana pokusa [4]. U ovome radu istražili smo učinak male doze gama zračenja na aktivnost fosfataza u krvnoj plazmi pilića izleženih iz jaja ozračenih sedmoga dana inkubacije.

### MATERIJAL I METODE

Pokuse smo načinili na pilićima hibridima tovne pasmine Avian (linija 34), oba spola, koji su se izlegli iz jaja ozračenih sedmoga dana inkubacije dozom od 0,15 Gy gama zračenja iz radioaktivnog <sup>60</sup>Co panoramskoga tipa (pokusna skupina). Zajedno s pokusnom skupinom imali smo i kontrolnu skupinu pilića izleženu iz neozračenih jaja. Svi ostali uvjeti bili su isti za obje skupine pilića. Tijekom tova pilići su hranu i vodu uzimali *ad libitum*. Piliće obje skupine odabrali smo nasumce, pa odnos spolova u pojedinoj skupini nismo točno utvrdili.

Krv za analizu uzimali smo iz srca, odnosno krilne vene u epruvete s heparinom kao antikoagulansom 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30. i 42. dana pokusa.

Aktivnost obiju fosfataza, ACP i alkalne fosfataze (ALP), određivali smo spektrofotometrijski koristeći gotove komplete reagencija proizvođača Boehringer Mannheim GmbH.

Rezultate smo statistički obradili i prikazali kao aritmetičku sredinu skupine ( $M$ ) zajedno sa srednjom greškom srednje vrijednosti ( $SE$ ), a značajnost među razlikama provjerili smo t-testom po Studentu [5].

## REZULTATI

Rezultati aktivnosti ACP u krvnoj plazmi pilića izleženih iz jaja ozračenih sedmoga dana inkubacije zajedno s rezultatima aktivnosti ACP u krvnoj plazmi pilića izleženih iz neozračenih jaja prikazani su u Tablici 1.

*Tablica 1.* Aktivnost ACP (U/L) u krvnoj plazmi pilića izleženih iz jaja ozračenih sedmoga dana inkubacije dozom od 0,15 Gy gama-zračenja (pokusna skupina) i u krvnoj plazmi pilića izleženih iz neozračenih jaja (kontrolna skupina).

Starost pilića (dani)	Skupina pilića	Uzorak (n)	SV $\pm$ $\sigma$
1.	Pokusna skupina	10	2,74 $\pm$ 0,49
	Kontrolna skupina	10	1,46 $\pm$ 0,30
3.	Pokusna skupina	10	1,83 $\pm$ 0,23**
	Kontrolna skupina	10	3,06 $\pm$ 0,28
5.	Pokusna skupina	10	1,74 $\pm$ 0,28**
	Kontrolna skupina	10	3,80 $\pm$ 0,63
7.	Pokusna skupina	10	1,73 $\pm$ 0,36
	Kontrolna skupina	10	3,05 $\pm$ 0,68
10.	Pokusna skupina	10	1,44 $\pm$ 0,30*
	Kontrolna skupina	10	3,73 $\pm$ 0,92
20.	Pokusna skupina	10	3,05 $\pm$ 0,52
	Kontrolna skupina	10	3,77 $\pm$ 0,88
30.	Pokusna skupina	10	9,08 $\pm$ 4,08
	Kontrolna skupina	10	4,52 $\pm$ 1,17
42.	Pokusna skupina	10	11,67 $\pm$ 2,37
	Kontrolna skupina	10	11,22 $\pm$ 3,75

\*P<0,05; \*\* P<0,01

## VII. simpozij HDZZ, Opatija, 2008.

Aktivnost ACP u krvnoj plazmi pokusnih pilića bila je statistički značajno smanjena 3, 5. i 10. dana pokusa. Tako je 3. dana pokusa aktivnost ACP u krvnoj plazmi pokusnih pilića bila  $1,83 \pm 0,23$  U/L, dok je u kontrolnoj skupini pilića iznosila  $3,06 \pm 0,28$  U/L ( $P < 0,01$ ). Petoga dana pokusa aktivnost ACP u krvnoj plazmi pokusnih pilića bila je  $1,74 \pm 0,28$  U/L, a u kontrolnoj skupini pilića iznosila je  $3,80 \pm 0,63$  U/L. Razlika je također značajna na razini 0.01. I, konačno, aktivnost ACP u krvnoj plazmi pokusnih pilića 10. dana pokusa bila je  $1,44 \pm 0,30$  U/L, dok je kontrolnoj skupini pilića iznosila  $3,73 \pm 0,92$  U/L ( $P < 0,05$ ).

Rezultati aktivnosti ALP u krvnoj plazmi pilića izleženih iz jaja ozračenih sedmoga dana inkubacije zajedno s rezultatima aktivnosti ALP u krvnoj plazmi pilića izleženih iz neozračenih jaja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Aktivnost ALP (U/L) u krvnoj plazmi pilića izleženih iz jaja ozračenih sedmoga dana inkubacije dozom od 0,15 Gy gama zračenja (pokusna skupina) i u krvnoj plazmi pilića izleženih iz neozračenih jaja (kontrolna skupina).

Starost pilića (dani)	Skupina pilića	Uzorak (n)	SV $\pm$ $\sigma$
1.	Pokusna skupina	10	4421,50 $\pm$ 332,78
	Kontrolna skupina	10	4102,50 $\pm$ 596,79
3.	Pokusna skupina	10	7874,10 $\pm$ 833,68
	Kontrolna skupina	10	8498,80 $\pm$ 810,87
5.	Pokusna skupina	10	12730,00 $\pm$ 847,16
	Kontrolna skupina	10	12403,30 $\pm$ 1417,75
7.	Pokusna skupina	10	5692,20 $\pm$ 462,69
	Kontrolna skupina	10	7685,00 $\pm$ 1229,83
10.	Pokusna skupina	10	8196,90 $\pm$ 763,20
	Kontrolna skupina	10	9741,00 $\pm$ 865,74
20.	Pokusna skupina	10	2543,70 $\pm$ 236,60
	Kontrolna skupina	10	2880,90 $\pm$ 196,03
30.	Pokusna skupina	10	5021,17 $\pm$ 750,54
	Kontrolna skupina	10	5011,40 $\pm$ 462,37
42.	Pokusna skupina	10	1254,50 $\pm$ 98,95
	Kontrolna skupina	10	1268,75 $\pm$ 123,12

Aktivnost ALP u krvnoj plazmi pilića koji su bili izleženi iz jaja ozračenih sedmoga dana inkubacije nije bila statistički promijenjena tijekom cijeloga pokusnoga razdoblja.

## RASPRAVA

Rezultati pokusa pokazali su da je aktivnost ACP u krvnoj plazmi pilića koji su izleženi iz jaja ozračenih sedmoga dana inkubacije dozom od 0,15 Gy gama zračenja bila statistički značajno smanjena 3, 5, i 10. dana pokusa, dok se aktivnost ALP u krvnoj plazmi istih pilića nije mijenjala tijekom cijeloga pokusnoga razdoblja. Ovi se rezultati razlikuju od rezultata dobivenih u pokusima na pilićima koji su bili izleženi iz jaja ozračenih prije inkubacije istom dozom zračenja. U tim je pokusima, naime, aktivnost ACP u krvnoj plazmi pilića bila statistički značajno povećana 42. dana pokusa. Koji je pravi razlog ovim razlikama, za sada je teško reći. No, čini se da je ionizirajuće zračenje – kada su jaja bila ozračena gama zračenjem prije inkubacije, dakle prije negoli je započeta intenzivna proliferacija stanica i diferencijacija organa – djelovalo poticajno na ukupan embrionalni ciklus. To se u konačnici očitovalo većom aktivnosti kako enzima tako i drugih parametara, pa čak i bržeg rasta pilića [6]. U ovom, pak, pokusu kada su jaja ozračena 7. dana embrionalnoga razvoja pilića, dakle u vrijeme intenzivne proliferacije i diferencijacije organa, nije isključeno da je doza gama zračenja od 0,15 Gy djelovala štetno na embrionalne stanice zbog smanjenog praga osjetljivosti, i to se nije moglo popraviti tijekom embrionalnoga razvoja, pa se to očitovalo smanjenjem aktivnosti ACP (i aktivnosti još nekih enzima [6]) tijekom cijelog pokusnog razdoblja.

Ovu pretpostavku temeljimo na istraživanjima Eidusa [7] koji kao najvažnije čimbenike za nastanak učinaka malih doza ionizirajućeg zračenja navodi nespecifičnu regulaciju enzimskih reakcija putem komponenti male molekularne mase [*engl. low molecular weight compounds*] (LMWC), njihov način djelovanja unutar stanice, te staničnu membranu kao alternativnu metu. U smislu ove pretpostavke, autor kaže, da se LMWC mogu nespecifično vezati slabim vezama na molekulu enzima te time sprečavati konformacijski raspored potreban za izvršenje enzimske funkcije. To znači da povećanje LMWC uzrokuje smanjenje aktivnosti enzima i obrnuto, smanjenje LMWC uzrokuje povećanje aktivnosti enzima. Osim toga, poznato je da stanična membrana neposredno nakon ozračivanja ionizacijskim zračenjem, dozama označenim kao male doze, pokazuje morfološke i funkcionalne promjene [8]. Tako nastale promjene uzrok su gubitka jednog dijela LMWC iz stanice. Posljedica toga je da se enzimske reakcije unutar stanice povećavaju. Međutim, osim povećanja enzimske reakcije, može doći i do smanjenja enzimske reakcije zbog, kako navodi Eidus [7] po-

remećaja membrana unutar stanice. Naime, taj poremećaj membrana uzrokuje poremećaj transporta tvari unutar stanice. To za posljedicu ima raspršivanje LMWC unutar stanice i inhibiciju enzimskih reakcija. Upravo na osnovi opisanog, autor [7] je naglasio da male doze ionizirajućeg zračenja mogu istodobno inicirati dva suprotna procesa, tj. aktivaciju enzimskih reakcija i njihovu inhibiciju. Također dodaje kako se razumije samo po sebi da se u različitim objektima (stanica, tkivo, organizam) zbog različitih okolnosti mogu razlikovati i učinci ionizacijskoga zračenja, prag doza i vrijeme nastanka učinka. U ovome pokusu ozračeni su embriji na završetku organogeneze i diferencijacije tkiva, dok u pokusu u kojemu su bila ozračena jaja prije inkubacije, organogeneza i diferencijacija tkiva nisu bili ni započeli. Prema tome, u ovim dvama pokusima razlikovali su se i objekt i okolnosti, pa odatle i razlike u dobivenim rezultatima.

## ZAKLJUČAK

Ozračivanje pilećih jaja dozom od 0,15 Gy gama zračenja sedmoga dana inkubacije, dakle u vrijeme kada je organogeneza završila, uzrokuje pad aktivnosti ACP u krvnoj plazmi pilića izleženih iz tih jaja 3, 5, i 10. dana pokusa dok se aktivnost ALP nije mijenjala tijekom cijeloga pokusnog razdoblja. Dobiveni rezultati razlikuju se od rezultata dobivenih u pilića izleženim iz jaja ozračenim istom dozom zračenja prije inkubacije; aktivnost ACP bila je tada statistički značajno povećana u krvnoj plazmi pilića 42. dana pokusa. Uzrok nađenim razlikama je, pretpostavljamo, različito vrijeme ozračivanja jaja.

## LITERATURA

- [1] Kraljević P, Vilić M, Miljanić S, Šimpraga M. Body weight, growth and enzymes activities in blood plasma of chickens hatched from eggs irradiated with low level gamma rays before incubation. (u tisku).
- [2] Kraljević P, Šimpraga M, Miljanić S, Vilić M. Effect of low doses gamma radiation upon some biochemical indicators in blood plasma of chickens (paper no. 3p-12). In: Obelić B, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Krajcar-Bronić I, eds. CD-ROM Proceedings of IRPA Regional Congress on Radiation Protection in Central Europe. "Radiation Protection and Health", May 20-25, 2001; Dubrovnik, Croatia, Zagreb: CRPA; 2002.
- [3] Todorov B, Dijanovski P. Enzyme activity in blood plasma of turkey and pheasant received from irradiated with small doses gamma rays eggs. Final Programme and Book of Abstracts of XV<sup>th</sup> Annual meeting of European Society of Nuclear Methods in Agriculture. European Society of Nuclear methods in Agriculture, Piacenza, 1984.

VII. simpozij HDZZ, Opatija, 2008.

- [4] Kraljević P, Vilić M, Miljanić S, Šimpraga M. Aktivnost transferaza u krvnoj plazmi pilića izležanih iz jaja ozračenih malom dozom gama-zračenja tijekom inkubacije. U: Garaj-Vrhovac, Kopjar N, Miljanić S, ur. Zbornik radova Šestog simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja; 18.-20. travnja 2005; Stubičke Toplice, Hrvatska. Zagreb: HDZZ; 2005. str. 173-7.
- [5] Renner E. Mathematisch-statistische Methoden in der praktischen Anwendung. Verlag Paul Perey, Berlin-Hamburg, 1970. 34-36.
- [6] Vilić M. Učinak male doze gama-zračenja na aktivnost nekih enzima i koncentraciju bjelančevina u krvnoj plazmi tovnih pilića. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2006.
- [7] Eidus LK. Hypothesis regarding a membrane-associated mechanism of biological action due to low-dose ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys* 2000;39:189-197.
- [8] Burlakova EB, Goloshchapov AN, Gorbunova NV, Gurevich SM, Zhizhina GP, Kozachenko AI, Konradov AA, Korman DB, Molochkina EM, Nagler LG, Ozerova IB, Skalatskaia SI, Smotriaeva MA, Tarasenko OA, Treshchenkova IA, Shevchenko VA. The characteristics of the biological action of low doses of irradiation. *Radiat Biol Radioecol* 1996;36:610-631.

**EFFECT OF LOW DOSES GAMMA RADIATION UPON  
PHOSPHATASE ACTIVITY IN BLOOD PLASMA  
OF CHICKENS HATCHED FROM EGGS IRRADIATED  
ON THE SEVENTH DAY OF INCUBATION**

*Petar Kraljević<sup>1</sup>, Marinko Vilić<sup>1</sup>, Saveta Miljanić<sup>2</sup> and Miljenko Šimpraga<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Department of Physiology and Radiobiology, Faculty of Veterinary Medicine,  
University of Zagreb, Heinzelova 55, HR-10000 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup>Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, HR-10000 Zagreb, Croatia  
e-mail: kraljev@vef.hr

In our earlier studies chickens hatched from eggs irradiated with 0.15 Gy gamma rays before incubation showed a significantly higher growth than controls during the fattening period (1-42 days). The activity of aspartate-aminotransferase (AST), alanine-aminotransferase (ALT), acid phosphatase (ACP) and plasma glucose in the same chickens were also significantly higher. These results suggested that low-dose gamma-radiation stimulated certain metabolic processes in chickens hatched from eggs irradiated before incubation. Investigating the effect of low dose gamma radiation upon transferases activity in blood plasma of chickens hatched from eggs irradiated on the 7th day of incubation, i.e. in the time when organogenesis is completely finished, we found that on day 10, AST and ALT activity was significantly higher in the blood plasma of those chickens, whereas it significantly dropped for both enzymes on day 20. This time the goal of study was to determine the effect of low-dose gamma radiation on ACP and alkaline phosphatase (ALP) activity in the blood plasma of chickens hatched from eggs irradiated on the 7<sup>th</sup> day of incubation. The eggs of heavy breeding chickens (Avian, line 34) were exposed to 0.15 Gy of gamma radiation (<sup>60</sup>Co) on the seventh day of incubation. The control group included chickens hatched from non-irradiated eggs. All other conditions were the same for both groups. After hatching, blood samples were taken from the wing vein on days 1, 3, 5, 7, 10, 20, 32 and 42. The activity of both enzymes was determined spectrophotometrically using Boehringer Mannheim GmbH optimised kits. ACP activity was significantly lower in the blood plasma of chickens hatched from irradiated eggs on day 3 (P<0,01), 5 (P<0,05) and 10 (P<0,05). Throughout the experimental period ALP activity did not statistically significantly change. Our results indicate that exposure of eggs to low-dose gamma radiation on the seventh day of incubation reduces ACP activity in the blood plasma of chickens hatched from irradiated eggs. Namely, this effect is somewhat different from the effect of egg exposure to low-dose gamma radiation before incubation. This difference is probably caused by the difference in the time of egg radiation.