

ЕРИТРОЇДНІ КЛІТИНИ-ПОПЕРЕДНИКИ У ОСІБ, ЩО ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ

На етапах проліферації і диференціації досліджено еритроїдні клітини-попередники в культурі клітин in vivo в осіб, що зазнали впливу іонізуючої радіації внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС. Результати свідчили про збільшення ефективності клонування примітивних еритроїдних клітин-попередників і вмісту фетального гемоглобіну в зрілих еритроїдних елементах. Поява в периферичній крові еритроцитів, наповнених фетальним гемоглобіном, пов'язується з підвищеною проліферацією бурстутворюючих одиниць і прискореною диференціацією еритроїдних попередників, що свідчить про зміни у клітинно-біохімічних процесах, спрямованість яких, мабуть, має адаптивний характер.

Гематологічний скринінг, проведений серед постраждалих від аварії на Чорнобильській АЕС [1; 2], показав, що еритроїдні показники у цих осіб зазнали змін, природа яких ще не розкрита. Відомо, що в основі механізмів післярадіаційного пошкодження і репарації кровотворної системи лежать зміни на рівні гемопоетичних клітин-попередників. Гемопоетична система як самовідновлювальна система з великим проліферативним потенціалом на етапах свого формування є найбільш вразливою до дії радіації. Мутації, які призводять до появи трансформованих клітин, можуть безпосередньо впливати на процес злосередного переродження. В останні роки достатньо повно описано гематологічні ефекти у дітей і

дорослих, які зазнали впливу гострого і хронічного опромінення в діапазоні доз, характерних для Чорнобильської аварії [3; 4]. Проведено глибокі дослідження в культурі тканин гемопоетичних клітин, які показали перебіг процесу відновлення клітин-попередників і вплив цих порушень на формування радіаційно-індукованих лейкемій, мієлодиспластичного синдрому (МДС) та інших онкогематологічних захворювань [5; 6]. Якісні зміни на рівні еритроїдних клітин-попередників у культурі в цій категорії осіб свідчить про функціональне порушення, яке залишилося в збережених стовбурових клітинах з моменту аварії на ЧАЕС. Відомо, що за останні 10 років кількість осіб з нормохромною анемією серед учасників

ліквідації наслідків аварії збільшилась у 5 разів [2; 3]. У зв'язку з цим є цілком доцільним провести детальне вивчення морфофункціональних змін еритроїдної ланки гемопоезу від найближчих попередників стовбурової клітини до зрілих її нащадків з метою виявлення можливих порушень цієї стадії гемопоезу в осіб, які брали участь у ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС і зазнали опромінення у різних дозах. Своєчасне виявлення таких змін на рівні початкових стадій гемопоезу дозволить запобігти більш серйозним порушенням у майбутньому. Таким чином, метою роботи було виявлення особливостей морфофункціональних змін еритроїдної ланки гемопоезу у осіб, які зазнали впливу іонізуючого опромінення в діапазоні доз, характерних для Чорнобильської аварії, і визначити їх роль у формуванні анемії.

Матеріали та методи

Культуральні дослідження проведені гемопоетичними клітинами 86 осіб, обстежених у відділі гематології Наукового центру радіаційної медицини АМН України. Перша група складалася з 25 осіб, які брали участь у ліквідації наслідків аварії, друга група - 17 реконвалесцентів гострої променевої хвороби 1-го і 2-го ступеня, третя група - 23 особи, що проживають на контрольованих територіях, четверта група - 21 особа, евакуйована із зони радіоактивного забруднення.

Гемопоетичні клітини, отримані у результаті стерильної пункції, досліджували в культурі з напіврідким агаровим гелем у дифузійних камерах, імплантованих у черевну порожнину мишей лінії СВА. У досліді використано 300 тварин. Для отримання еритроїдних клітин-попередників була вибрана модель гемопоетичного стресу як джерела бурстпромоторної активності. Анемізували тварин шляхом кровопускання, введення гемолітичної отрути (фенілгідрозину) або рекомбінантного еритропоєтину (USA). Лише введення фенілгідрозину за схемою забезпечило тривалу відносно часу проведення експерименту анемізацію мишей - реципієнтів камер. Інші способи виявилися непридатними через варіабельність отриманих результатів і низьку ефективність клонування. Рівень анемізації тварин визначали за кількісними і якісними показниками їх крові: гемоглобіну в г/л, кількості еритроцитів у розрахунку на 1 л, формених елементів крові. З метою одержання фракції мононуклеарів кровотворної клітини центрифугували в градієнті густини лімфопрепу фірми Serva (США) (густина градієнта 1,077 г/мл) при режимі 650g протягом 30 хв з наступним триразовим відмиванням у сольовому буферному розчині PBS

без магнію та кальцію. Клітинну суспензію змішували з основним живильним середовищем, що містило RPMI, фетальну телячу сироватку, 0,33 % агар Difco та антибіотики, і вводили усередину гелевих дифузійних камер. Камери імплантували в черевну порожнину тварин. Для вивчення кінетики утворення клонів щодня забивали по 2 миші і досліджували культуру за допомогою інвертованого мікроскопа безпосередньо в камері (окуляр x10, об'єктив x10). Ефективність клонування еритроїдних клітин-попередників визначали на 18-й день культивування за числом бурстів, що виросли. Вибірково готували препарати за допомогою цитоцентрифугування і фіксували для цитологічного фарбування. Частина препаратів фіксували за Май-Грюнвальдом протягом 3 хв і забарвлювали барвником Романовського-Гімзи фірми BDH (Великобританія) протягом 4-7 хв. Оскільки при дозріванні еритробластів відбувається гемоглобінізація еритроїдних клітин, то для їхнього виявлення було застосовано фарбування з О-діанідизином (3,3-диметоксибензидином) фірми Koch-Light (Великобританія). Фіксувану в метанолі протягом 10 хв культуру на предметному склі занурювали в суміш, що містить О-діанідизин, 3 %-ний перекис водню і нітрофериціанід фірми Sigma (CUA), інкубували в темряві 10 хв, змивали і дофарбовували барвником Романовського-Гімзи. Попередня фіксація препаратів у метанолі сприяла супресії гранулоцитарної пероксидази. Клітини, що дають позитивну цитоплазматичну реакцію на гемоглобін, зафарбовувалися, залежно від його вмісту, від жовтого й оранжевого до темно-коричневого.

Результати та їх обговорення

Результати культивування еритроїдних попередників (колонієутворюючих еритроїдних одиниць (КУО-Е), бурстутворюючих пізніх еритроїдних одиниць (БУОп-Е), бурстутворюючих ранніх еритроїдних одиниць (БУОр-Е)) в обстежених групах населення демонструють існуючу гетерогенність. Однак у ній можна розрізнити особливості, характерні для визначених груп, пов'язані зі стимуляцією еритроїдного паростку. Якщо з обстежуваних осіб виділити пацієнтів з анемією, яких у першій групі було 7, у другій - 3, у третій - 6, а в четвертій - 7 (всього 23), і об'єднати їх в окрему групу, можна отримати вірогідне збільшення ефективності клонування БУОр-Е порівняно з контролем. Так, ЕКУ (ефективність клонування) бурстутворюючих клітин-попередників, отриманих з кісткового мозку осіб з виявленою у них анемією, становив $32,1 \pm 2,8$, тоді як у контролі цей показник складав $23,0 \pm 3,9$ клонів на $1-10^5$ експлантованих клітин.

Еритроїдні клітини-попередники у цих пацієнтів формували бурсти із молодих проліферуючих еритроїдних клітин замість дозріваючих і зрілих, що спостерігалось в контролі. У препаратах, зафарбованих за Паппенгеймом, визначали клітини еритроїдного ряду, серед яких переважали проеритробласти і базофільні еритробласти, що становили 80 % клітин у колонії, тоді як у контрольних зразках на примітивні клітини припадало 10-15 %. Порушення диференціювання в еритроїдних бурстах у групі зазначених осіб підтверджено даними цитохімічного аналізу. У препаратах, забарвлених О-діанидином, еритроїдні клітини давали негативну і слабкопозитивну цитоплазматичну реакцію на гемоглобін і значно відрізнялися від контролю.

Менш вираженими виявилися зміни на рівні ранніх клітин-попередників у осіб, які проживають на контрольованій території, однак у виділених з їх числа працівників лісництва (10 осіб) аналіз культивування кровотворних клітин показав, що стимуляція еритроїдного паростка у цих осіб значно перевищує дані контролю, її можна порівняти з аналогічними результатами культивування у групі осіб, які проживають на контрольованій території. Дані ЕКО цієї групи становили $30,3 \pm 1,7$ на $1 \cdot 10^5$ експлантованих клітин. В осіб, евакуйованих із зони підвищеної радіації, дані культивування еритроїдних клітин-попередників майже не відрізнялися від контролю.

Дослідження типів гемоглобіну в осіб, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання, показало, що при підвищенні бурстутворення в культурі підвищується рівень фетального гемоглобіну. Так, рівень фетального гемоглобіну (ФГ) в осіб, що брали участь у ліквідації наслідків аварії, дорівнює $5,9 \pm 0,3$ %, у осіб, які перенесли гостру променеву хворобу - $6,5 \pm 0,2$ %, а вміст клітин, наповнених ФГ - $6,1 \pm 0,26$ % і $6,3 \pm 0,4$ %, тоді як у контролі ці показники становлять $3,9 \pm 0,2$ % і $3,2 \pm 0,18$ % відповідно ($P < 0,001$).

Поява в периферичній крові еритроцитів, наповнених фетальним гемоглобіном, може бути результатом підвищеної проліферації бурстутворюючих одиниць і прискореної диференціації еритроїдних попередників.

При аналізі отриманих результатів привертає увагу те, що кількість ФГ-клітин збільшується в обстежених пацієнтів пропорційно рівню ФГ. При цьому зростає співвідношення між рівнем ФГ і кількістю ФГ-заповнених клітин, що вказує на збільшення кількості останніх. Звідси логічно випливає висновок про появу клітин із різною інтенсивністю диференціації в ході проліферації. Результати наших досліджень збігаються з даними про те, що у період регенерації кісткового мозку відбувається не тільки посилення темпу поділу тотипотентних стовбурових клітин і збільшення кількості спеціалізованих стовбурових клітин, але й скорочення транзитного часу дозрівання клітинних елементів [7; 8].

Порівняльний аналіз цитологічних і біохімічних параметрів еритроїдних елементів показав, що якщо на рівні ранніх клітин-попередників у осіб, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання, спостерігається збільшення ефективності клонування, то на стадіях розвитку клітин, які морфологічно ідентифікуються, відбувається накопичення фетального гемоглобіну (замість гемоглобіну А). Встановлений факт узгоджується з даними наукової літератури [9; 10] про молекулярно-клітинний механізм переключення синтезу окремих типів гемоглобіну в умовах стресу, що призводить до перебудови фракційного складу гемоглобіну. Крім того, отримані дані свідчать, що в потерпілих порушується весь комплекс клітинно-біохімічних процесів, спрямованість яких, найімовірніше, має адаптивний характер.

1. Baranov A., Guskova A., Nadejina N., Nugis V. Chernobyl experience: Biological indicators of exposure to ionizing radiation // *Stem Cells*.- 1995.- V. 13.- № 1.- P. 69-77.
2. Бебешко В. Г., Коваленко А. Н., Чумак А. А. Клинические аспекты последствий аварии на Чернобыльской АЭС на этапе 1986-1990 гг. (Основные направления научных исследований) // *Вестн. АМН СССР*.- 1991.- № 11.- С. 14-18.
3. Зверкова А. С., Федоровская Е. А., Назарчук Л. В. Критерии формирования групп риска среди населения, подвергнутого воздействию ионизирующего излучения после аварии на Чернобыльской АЭС // *Врачебное дело*.- 1994.- № 5-6.- С. 87-93.
4. Клименко С. В., Бишко Н. М., Зотиков Л. А., Клименко В. И. Особенности функционирования гемопоэтической системы у реконвалесцентов острой лучевой болезни в отдаленный период после воздействия ионизирующей радиации // *Український журнал гематології та трансфузіології*.- 2002.- № 4.- С. 48-51.
5. Debili N., Coulombel L., Croisille L. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow // *Blood*.- 1996.- V. 88.- № 4.- P. 1284-1296.
6. Билько Н. М. Эритроидные клетки-предшественники в культуре ткани у лиц, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации // *Цитология и генетика*.- 1997.- Т. 31.- № 5.- С. 60-66.
7. Билько Н. М., Брумбаров К., Кросс М., Вобус А. Тотипотентная стволовая клетка и гемопоэз // *Ветеринарная патология*.- 2003.- № 1 (S).- С. 22-24.
8. Стародуб Н. Ф., Назаренко В. И. Гетерогенная система гемоглобина.- К.: Наук. думка, 1987.- 200 с.
9. Билько Н. М., Стародуб Н. Ф., Бебешко В. Г., Терновой К. С. Состояние системы эритрона у взрослых лиц, подвергшихся радиационному воздействию в результате Чернобыльской аварии // *Цитология и генетика*.- 1996.- Т. 30.- № 4.- С. 55-62.
10. Feinendegen L., Loken M., Booz L. Cellular Mechanisms of protection and repair induced by radiation exposure and their consequences for cell system responses // *Stem Cells*.- 1995.- V. 13.- Jfe1.- P. 7-20.

M. Barabuha, M. Kaplenko, D. Bilko

ERYTHROID PROGENITOR CELLS IN PATIENTS, EXPOSED AS RESULT OF THE CHORNOBYL ACCIDENT

Red blood progenitor cells were investigated on the stages of proliferation and differentiation in cell culture in vivo. Cells were taken from people impacted by the accident on the Chornobyl nuclear power plant. Both growth in cloning efficiency of primitive red blood cells progenitors and fetal hemoglobin content of mature red cells elements were noticed. Appearance of red blood cells with fetal hemoglobin in peripheral blood we connect with increased proliferation of burst-forming units and boosted differentiation of red blood progenitor cells. This fact suggests that the defect of the whole complex of physiological cell processes occurred. We suspect that direction of these processes has an adaptive nature.