

УДК 616-001.28+616.15:599.323.45

Носова Л. І., Алесіна М. Ю.

СТАН КЛІТИННОЇ ЛАНКИ В СИСТЕМІ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ЗАХИСТУ ОРГАНІЗМУ ОПРОМІНЕНИХ ЩУРІВ

У статті наведено результати дослідження динаміки показників неспецифічної резистентності білих лабораторних щурів, яких піддавали хронічному (впродовж 12 міс.) радіаційному навантаженню в умовах зони відчуження ЧАЕС. Встановлено, що при тривалому внутрішньому і зовнішньому опроміненні у діапазоні малих доз (від 0,2 до 50 сГр) стан клітинної ланки природного імунітету тварин залежить переважно від тривалості формування поглиненої дози на тіло (від різних джерел іонізуючого випромінювання), а не від її величини.

Природний імунітет (або неспецифічна резистентність) виявляється в здатності всіх живих

організмів протистояти дії несприятливих чинників навколишнього середовища завдяки су-

купності механізмів, що забезпечують елімінацію чужорідної генетичної інформації або ліквідацію наслідків її дії [1].

Нейтрофільні гранулоцити - центральні клітини природного імунітету, а їх фагоцитарна активність є одним з його основних механізмів [2]. Варто мати на увазі також, що і специфічний імунітет може розвинути тільки з участю нейтрофілів завдяки їх комунікаційним зв'язкам з лімфоцитами, макрофагами та іншими клітинами. Нейтрофільні гранулоцити є обов'язковими клітинними компонентами, необхідними для підтримки загального імунного статусу і сталості внутрішньоклітинного середовища.

Еритроцити теж задіяні в системі неспецифічного захисту: вони спроможні зв'язувати комплемент (гуморальний фактор системи неспецифічної резистентності), що активізується як імунними комплексами, так і активаторами неімунної природи. Крім того, еритроцити беруть участь в опсонінопосередкованому фагоцитозі [3].

Критерії оцінки біологічної дії радіонуклідів на організм дотепер недостатньо розроблені, тому актуальним є застосування нових підходів до аналізу гематологічних показників.

Метою нашого дослідження було вивчення за допомогою оригінальних гематологічних тестів стану клітинної ланки в системі неспецифічної резистентності та масштабів компенсаторно-відновлювальних реакцій організму щурів при тривалому комбінованому радіаційному навантаженні у малих дозах.

Матеріал і методи

Об'єктами досліджень були самці білих лабораторних щурів (100), вік та маса яких на початку експерименту становили відповідно 3,5—4 міс. і ІS0-200 г. Тварини були розподілені на 3 груп (з умовними позначками - D₁ D₂ і D₃), які піддавали 12-місячному впливу одночасного внутрішнього та зовнішнього опромінення у виварії Чорнобильського науково-технічного центру міжнародних досліджень. Гамма-фон коливався в діапазоні від 40 до 60 мкР/год; щурів затруювали забрудненими радіонуклідами кормами (зерно, м'ясо й риба) і питною водою, радіоактивність якої відрізнялась в групах у 10 разів. Тварин

декапітували (за допомогою гільйотини) через 1,5; 4 і 12 міс. Контрольні щури (100) перебували у виварії Інституту ендокринології й обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМНУ (гамма-фон становив 12-18 мкР/год) і одержували «чисті» корм і воду. У всіх забитих тварин відбирали зразки периферичної крові (ПК) для гематологічних досліджень.

Сумарні поглинені дози (ПД) розраховували із застосуванням математичних моделей [4, 5]. До уваги брали вміст основних дозоформувальних РН (¹³⁴Cs, ¹³⁷Cs й ⁹⁰Sr + ⁹⁰Y) через те, що кількість трансуранових елементів у раціоні перебувала за межами чутливості приладів. Величини сумарних ПД наведено у табл. 1.

При вивченні клітинних елементів ПК використано авторські тести [6, 7]. Для визначення ступеня ендогенної інтоксикації розраховували індекс інтоксикації (ІІ); рівень адаптаційного потенціалу гранулоцитів оцінювали за індексом гетерофілів (ІГ). Наявність «прихованого» гемолізу визначали за показниками зниження осмотичної резистентності еритроцитів (РЕ). Кожний зразок крові аналізували у такій спосіб і складали діагностичну карту (табл. 2).

Оцінка ендогенної інтоксикації базується на феномені утворення пальцеподібних випинань у ядрах нейтрофілів, включаючи тільки Бара (статевий хроматин). Запропонована формула [6] дає можливість визначити стадії розвитку інтоксикації ще до появи клінічних ознак. Відновлення фагоцитарної функції нейтрофілів після її порушення у результаті радіаційного впливу супроводжується активацією пероксидазної системи. Процес починається за умов передачі субодниць пероксидазної системи еозинофілів дозрілим нейтрофілам [8]. Внаслідок трансгрануляції в кістковому мозку (передача гранул або секреція їхнього вмісту) з'являються в периферичній крові гетерофіли (гранулоцити нейтрофільної природи з домішкою еозинофільних гранул або з оксифільною реакцією частини первинних гранул). Динаміка змін ІГ у ПК дозволяє судити про глибину і масштаб адаптаційного синдрому па клітинному та субклітинному рівнях в системі кровотворення [7]. Сутність «прихованого» гемолізу полягає в укороченні терміну життя ери-

Таблиця 1. Сумарні поглинені дози в експериментальних тварин, сГр

Усе тіло	Тривалість опромінення (міс.)								
	1,5	4	12	1,5	4	12	1,5	4	12
	D ₁ (макс.)			D ₂ (середн.)			D ₃ (мін.)		
	7,3	15,0	50,8	0,7	1,5	5,1	0,2	0,5	1,7

Таблиця 2. Паспортизація досліджуваних зразків крові

Тест	Основа	Показник	Характеристика стану (підкреслити)
1. Реакція ядер нейтрофілів на інтоксикацію	Підрахунок пальцеподібних випинань у ядрах нейтрофілів	II	Ендогенна інтоксикація: відсутня середньої важкості сильна
2. Компенсаторно-приспосувальні реакції в популяції гранулоцитів	Реєстрація гранулоцитів з нейтрофільно-еозинофільною зернистістю	IG	Компенсаторно-відновлювальні реакції: в межах норми напружені інгібовані зрив адаптації
3. «Прихований» гемоліз	Особливості морфології еритроцитів	PE	Гемоліз: відсутній «прихований» прогресуючий

троцитів від 120 до 20 днів, що пов'язують [9] з ушкодженням їхньої оболонки і ферментних систем токсичними метаболітами. Ідентифікація «прихованого» гемолізу проводиться на підставі морфологічного критерію (наявність шизоцитів, астроцитів та інших видозмінених форм еритроцитів) при відповідних розрахунках загальної кількості еритроцитів і відсотка мікроцитів серед них. Підвищене руйнування еритроцитів – не завжди анемія; вона розвивається, якщо компенсаторна спроможність еритроцитів відстає від швидкості їхнього руйнування. Популяція еритроцитів зазвичай зазнає найменших змін при різних впливах. Пояснюють це тим, що здоровий кістковий мозок може збільшувати продукцію еритроцитів у 6-8 разів [9].

Отримані дані оброблені загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення

У наших попередніх експериментах [10] на щурах, що утримувалися в 1992-1994 рр. у Чорнобилі, а також на сірих пацюках, яких відловлювали у Зоні відчуження, встановлено, що внутрішньоклітинні і міжклітинні перебудови в процесі адаптації призводять до зміни характеру крові з *первісного лімфоцитарного на нейтрофільний* (який у філогенетичному ряді хребетних є більш древнім). Крім того, стосовно щурів і норок нами було введено поняття «гетерофіл» при ідентифікації клітин крові зі змішаною зернистістю (доведено, що нейтрофіли можуть запозичувати еозинофілпероксидазу при дефіциті власної мієлопероксидази; остання на відміну від еозинофілпероксидази інгібується під час радіаційного впливу [2]).

Вивчення структури клітин білих щурів дозволило встановити, що гетерофіли з поодино-

кими оксифільними (еозинофільними) гранулами спостерігаються й у нормі (до 10 % усіх нейтрофілів). Зазвичай при підрахунках лейкоцитарної формули цей факт залишається непоміченим. У той же час при значному збільшенні кількості оксифільних гранул в нейтрофілах ці клітини помилково вважають еозинофілами. У зв'язку з цим необхідно досить обережно ставитися до результатів спостережень еозинофілії в ПК після опромінення, тому що саме за цих обставин оксифілія нейтрофільних гранулоцитів стає помітною, але мова повинна йти в цьому випадку про гетерофілі нейтрофільного ряду.

Висловлено припущення [2, 8], що еозинофіли утворюють у кістковому мозку резерв клітин-донорів пероксидази, тому що вони можуть екстрацелюлярно виділяти її у вигляді субодиниць, сконцентрованих у паракристалічній серцевині специфічних гранул. Відомо [11-13], що мієлопероксидаза в нейтрофілах складається з трьох субодиниць з молекулярною масою 57 кДа, 39 кДа і 15 кДа, молекулярна маса субодиниць еозинофілпероксидази – 50 кДа і 15 кДа. Імовірно, що нейтрофіли запозичують субодиниці саме з молекулярною масою 15 кДа. Секреція пероксидази і трансгрануляція здійснюються переважно за мерокриновим типом секреції, хоча можливий також апо- і голокриновий.

Зростання кількості гетерофілів у ПК є позитивною діагностичною ознакою і може бути віднесене до компенсаторно-приспосувальних реакцій організму, оскільки пероксидазна система забезпечує бактерицидні і цитотоксичні функції клітин.

При інтерпретації отриманих результатів також враховували, що сезонні коливання в морфологічному складі ПК лабораторних щурів незначні і ними можна знехтувати. Що ж до вікових

змін, то, за даними літератури [9], найбільш істотні відмінності у вмісті нейтрофілів (майже в 2 рази) відмічено в інтервалі 2-4 міс; в нормі зазвичай зберігається лімфоцитарний характер крові. Оскільки в роботі використовувались тварини різного віку: при 1,5-місячному опроміненні-4,5-5 міс, при 4-місячному терміні впливу - 7-8 міс, при 12-місячному затруєнні - 15-16 міс, отримані дані зіставляли з показниками відповідної вікової групи інтактних тварин (ІК).

Як виявилось, у щурів після 45-добового радіаційного навантаження в трьох дозах (табл. 3) лімфоцитарний характер крові в усіх групах зберігається, проте збільшувалась популяція нейтрофілів з лівим зсувом (за рахунок паличко-ядерних нейтрофілів) під впливом доз D_1 і D_2 (ПД на тіло тварин 7,3 і 0,7 сГр). У цих групах підвищувався також вміст моноцитів у крові. У тварин, що отримували найменшу дозу опромінення (D_3 ; ПД на тіло 0,2 сГр), відхилення від нормальних величин були незначними. При цитологічному дослідженні структурно-якісних порушень у клітинах ПК зареєстровані одиничні випадки «променеви» реакцій клітин: у групах 3 більш високими рівнями дозового навантаження (D_1 і D_2) - псевдопельгсрову аномалію у нейтрофілах і бінуклеарних лімфоцитах, а при слабкому впливі (D_3) - множинні ознаки анемії (мішенеподібні еритроцити, стоматоцити й ііі.). Найменша величина П була у групі D_3 , середня - у тварин, які були опромінені дозою D_1 , і найвища - у групі E_x . ІГ наростав обернено пропорційно дозі (від дози D_1 до D_3). Тест на РЕ в усіх групах був збільшений на порядок у порівнянні з величиною в групі ІК, причому практично одна-

ковий у тварин з крайніми величинами доз опромінення.

При опроміненні тварин протягом 4 міс. мінімальною дозою (ПД на все тіло становила 0,5 сГр) спостерігали різку зміну характеру крові - з лімфоцитарного на нейтрофільний. Вірогідно, що це гальмувало інтоксикацію впродовж пролонгації радіаційного впливу до 12 місяців (ПД = 1,7 сГр) і призводило до нормалізації гематологічних показників (табл. 3). 120-добове дозове навантаження супроводжувалося пригніченням П, але наприкінці дослідження (через 12 міс.) цей показник відновлювався (за типом зворотного зв'язку). Він змінювався у діапазоні величин, які не порушують стану гомеостазу, а гемоліз еритроцитів теж коливався в межах фізіологічної норми.

Треба відмітити, що у тварин, які зазнавали максимального радіаційного впливу (доза D_1), П, підвищений вже після 1,5 міс. опроміненням (ПД = 7,3 сГр) (табл. 4), ще більше зростав через 4 міс. (ПД = 15 сГр) і такі високі значення зберігалися до 12 міс. терміну експерименту (ПД = 50 сГр;). В той же час ІГ, який свідчить про повноцінність компенсаторно-приспосувальних реакцій, вказував на стимуляцію трансгрануляції через 1,5 міс опромінення та її зниження в період з 4 по 12 міс. Однак зриву адаптації не спостерігалось. Натомість лейкограма крові щурів, яких опромінювали протягом року, відповідала лейкоцитарній формулі дворічних тварин, що є ознакою передчасного старіння організму і свідчить про можливе скорочення тривалості життя. «Прихований» гемоліз має мінливий характер і статистичній обробці не підлягає, реєструються ознаки анемії.

Таблиця 3. Лейкограми білих щурів після хронічного опромінення впродовж року, % ($M \pm m$ при $p = 0,05$)

Тривалість спостережень, міс.	Група тварин	Нейтрофіли: паличко-сегментоядерні		Еозинофіли	Моноцити	Лімфоцити
1,5 4 12	D_1	$7,7 \pm 0,3$ $5,4 \pm 0,5$ $17,0 \pm 0,3$	$18,0 \pm 0,9$ $16,8 \pm 0,6$ $25,7 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,01$ $0,8 \pm 0,03$ (1)	(9) (9,8) $3,7 \pm 0,6$	$64,6 \pm 0,6$ $67,2 \pm 0,2$ $52,6 \pm 0,3$
1,5 4 12	D_2	$11,3 \pm 0,2$ $7,0 \pm 0,32$ $12,0 \pm 0,7$	$17,0 \pm 0,3$ $13,4 \pm 0,5$ $27,0 \pm 0,5$	(0,5) (0,6) (1)	(8,7) (3,8) (0,5)	$62,5 \pm 0,3$ $75,2 \pm 0,4$ $59,5 \pm 0,7$
1,5 4 12	D_3	$4,7 \pm 0,2$ $11,4 \pm 0,5$ $11,1 \pm 0,2$	$16,0 \pm 0,3$ $55,0 \pm 0,4$ $20,5 \pm 0,5$	(0,3) (0,2) (0,5)	(4) (6,8) (2)	$75,0 \pm 0,5$ $26,6 \pm 0,4$ $65,9 \pm 1,0$
1,5; 4; 12	ІК	$3,0 \pm 0,3$ $8,0 \pm 0,4$	$15,3 \pm 0,4$ $28,0 \pm 0,6$	(1,3) (1)	(3,0) (1)	$77,3 \pm 0,5$ $62,0 \pm 0,4$

Таблиця 4. Діагностична карта за комплексом тестів у популяції гранулоцитів білих щурів після хронічного опромінення впродовж року

Тривалість спостережень, міс.	Група тварин	II	IG
1,5 4 12	D ₁	6,9 ± 0,33 26,4 ± 0,75 30,1 ± 0,58	16,3 ± 0,23 11,2 ± 0,58 13,6 ± 0,43
1,5 4 12	D ₂	9,6 ± 0,43 29,2 ± 0,37 41,0 ± 1,70	29,7 ± 0,53 7,0 ± 0,45 10,3 ± 0,54
1,5 4 12	D ₃	1,9 ± 0,03 20,6 ± 0,80 18,3 ± 0,48	35,0 ± 0,35 6,6 ± 0,50 12,5 ± 0,50
1,5; 4 12	Контроль	0,1 ± 0,01 5,7 ± 0,38	8,1 ± 0,23 9,5 ± 0,32

При середньому рівні дозового навантаження зміни у крові відмічено тільки на початку експерименту при малій ПД (0,7 сГр). Однак тривалість опромінення до 4 міс. і зростання ПД до 1,5 сГр супроводжувались відносною нормалізацією лейкоцитарної формули і після річного впливу (ПД = 5 сГр) теж характеризувалися певною збалансованістю. При цьому відмічались факти фагоцитозу нейтрофілами тромбоцитів (патологічних форм) і мікроцитів, «прихований гемоліз» пролонгованого характеру.

Таким чином, отримані результати вказують на те, що при довгостроковому комбінованому (внутрішньому та зовнішньому) опроміненні тварин зміна показників неспецифічної резистентності більше залежала від тривалості формування ПД на тіло, ніж від її величини.

Висновки

1. Розроблені гематологічні тести виявляють різноспрямовані реакції гранулоцитів (насамперед нейтрофілів) на різні дози комбінованого опромінення. Вони дозволяють виявити складність компенсаторно-приспосувальних реакцій, які підтримують гомеостаз та можуть бути використані у діагностичних цілях у людини.
2. Збільшення тривалості радіаційного навантаження в малих дозах призводить до поступового виснаження резервних можливостей клітинної ланки імунітету, спрямованих на збереження фізіологічного балансу формених елементів крові, що може прискорювати старіння організму (скорочувати тривалість життя).
3. Отримані дані суттєво доповнюють сучасні уявлення щодо функціональної активності клітин, які забезпечують природний імунітет.

1. Фримель Х., Ерок Й. Основы иммунологии / Пер. с нем. Тарасова П. М - М.: Мир, 1986.- 254 с.

2. Бережная Н. М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз.- К.: Наук. думка, 1988.- 190 с.

3. Горышина Е. Н., Чага О. Ю. Сравнительная гистология внутренней среды с основами иммунологии.- М.: Изд. МГУ, 1990.- 320 с.

4. Борисова В. В., Запольская Н. А., Павлицкая Е. Д. Экспериментальная проверка различных моделей на основе обмена в костной ткани Sr₉₀ и Cs₁₃₇ // Распределение и биологическое действие радиоактивных изотопов.- М.: Атомиздат, 1976. - С. 68-70.

5. Козлов В. Ф. Справочник по радиационной безопасности.- М.: Энергатоиздат, 1987.- 292 с.

6. Загоруйко Е. Е., Носова Л. И., Сватко Е. И., Кононенко С. М. Способ определения эндогенной интоксикации / Авторское свидетельство СССР.- 1988.- № 285645.

7. Носова Л. П., Панченко Н. А., Филимонов И. С. и др. Способ определения адаптационных возможностей организма / Патент РФ на изобретение.- 1995.- № 2013631 (приоритет 1991 г.).

8. Панченко Н. А., Носова Л. И., Филимонов М. С. и др. Гетерофильные гранулоциты крыс при облучении // Цитология и генетика. - 1992.- Т. 26.- № 2.- С. 21-24.

9. Кинетика форменных элементов крови / Мосягина Е. Н., Владимирская Е. Б., Торубарова Н. А. и др.- М.: Медицина, 1976.- 272 с.

10. Носова Л. И., Рясенко В. И., Родионова Н. В. Влияние малых доз радиации на кроветворную функцию костного мозга позвоночных // Проблемы Чернобыльской зоны отчуждения.- 1996.- № 3.- С. 100-104.

11. Sadaki Y., Hiroshi T., Keitano K. Localisation of lysosomal and peroxysomal enzymes in the specific granules of rat intestinal eosinophil leucocytes revealed by immunoclectron microscopic techniques // J. Histochem. and Cytochem.- 1984.- V. 32.- P. 267-274.

12. Presentey B. Ultrastructure of human eosinophiles genetically lacking peroxidase // Acta Hematol.- 1989.- V. 71.- N 5.- P. 334-340.

13. Olsen R. L., Little C. Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood // Biochem. J.- 1983.- V. 209.- N 3.- P. 781-787.

L. I. Nosova, M. Yu. Alesina

THE STATE OF A CELLULAR STAGE IN SYSTEM OF NONSPECIFIC RESISTANCE IN THE ORGANISM OF THE IRRADIATED RATS

Research results of the dynamics in parameters of nonspecific resistance of white laboratory rats-males are presented in the article. White laboratory rats-males were exposed to the chronic (during 12 months) radiation in the aloofzone conditions near Chernobyl atomic power station.

It was established that during prolonged internal and external irradiation in a range of small dozes (from 3 up to 5 cGy) the condition of a cellular stage of natural immunity of animals depends substantially on duration of formation of the absorbed doze per body (from different sources of ionizing radiation) than from its dimension.