

Е.И. СТЕПАНОВА,
О.А. ДАВИДЕНКО, В.Ю. ВДОВЕНКО

Научный центр радиационной медицины АМН Украины, Киев

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК КРОВИ ВНУТРИУТРОБНО ОБЛУЧЕННЫХ ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ РАДИОНУКЛИДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ



В динамике послеварийного периода проведены электронно-микроскопические исследования лимфоцитов и нейтрофилов циркулирующей крови у детей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения в период внутриутробного развития и на последующих этапах онтогенеза. Выявлен ряд изменений ультраструктуры лимфоцитов: повышенная извилистость контуров ядра с расширением перинуклеарного пространства, повышение плотности митохондрий и дезорганизация крист, расширение просвета цистерн цитоплазматической сети, нарушение структуры электронно-плотных гранул. Установлены особенности ультраструктуры нейтрофилов, характеризующиеся очаговым расширением перинуклеарного пространства, снижением гликозом, нарушением структуры гранул, наличием вакуолей, дегрануляцией цитоплазмы и гиперсегментацией ядра.

© Е.И. СТЕПАНОВА, О.А. ДАВИДЕНКО,
В.Ю. ВДОВЕНКО, 2006

Введение. Известно, что гемопоэтическая система является одной из наиболее чувствительных к радиационному воздействию [1]. При этом структурные изменения, возникающие в клетке, могут обусловить существенные нарушения ее способности к выполнению специфических функций [2—5].

Цель настоящей работы — изучить особенности ультраструктурной организации клеток крови у детей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения в период внутриутробного развития и на последующих этапах онтогенеза.

Материалы и методы. Объектом исследования явились 35 детей, родившихся с 24.04.1986 по 22.02.1987 гг. и постоянно проживающих на территориях с плотностью загрязнения радиоцезием более 555 кБк/м². Их обследование проводили в возрасте 3—6 лет (1990—1993 гг.) и 15—17 лет (2002—2004 гг.). Накопленная суммарная эквивалентная доза облучения красного костного мозга в эти возрастные периоды составляла 15,4—56,2 и 20,0—86,6 мЗв соответственно. Контрольную группу составили 15 детей, постоянно проживающих в «чистых» регионах.

Кровь для электронно-микроскопического исследования получали из локтевой вены, стабилизировали гепарином и выделяли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку. Согласно методическим приемам, специально разработанным для исследования клеток крови и кроветворных органов [6], в качестве фиксатора применяли 2,5%-ный раствор глутарового альдегида с постфиксацией 1%-ной тетраоксидом осмия в 0,1 М фосфатном буфере. Затем проводили обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, ацетоне и заключали в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме ЛКВ-III, контрастировали по стандартной методике и изучали в электронном микроскопе ЭМ-125К. Распределение лимфоцитов по группам основывалось на общепринятых морфологических критериях. Выделяли большие, средние и малые лимфоциты, а также большие гранулосодержащие лимфоциты (БГЛ).

Результаты исследования и их обсуждение. Данные электронно-микроскопических исследований свидетельствуют о том, что у детей в возрасте 3—6 лет (1990—1993 гг.) с суммарной эквивалентной дозой облучения красного костного мозга 15,4—56,2 мЗв наблюдалось

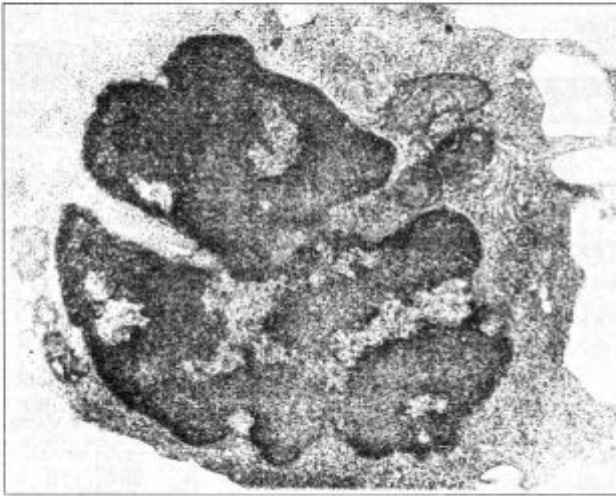


Рис. 1. Лимфоцит крови ребенка Д., облученного внутриутробно. Повышенная извилистость ядра, расширение ядерных пор. В цитоплазме гипертрофия комплекса Гольджи, вакуолизация ЭПГ, дезорганизация крист митохондрий. $\times 22\ 000$

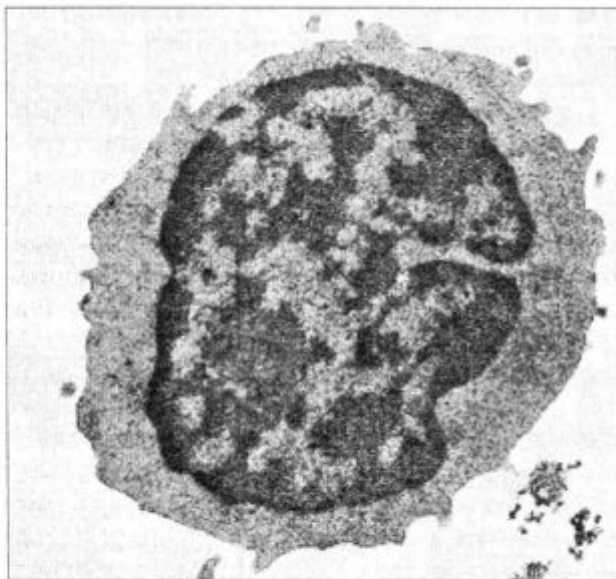


Рис. 2. Лимфоцит периферической крови практически здорового ребенка Т. Ядро бобовидной формы с четко контурированным ядрышком. В цитоплазме рибосомы, единичные митохондрии. $\times 12\ 000$

увеличение числа лимфоцитов с морфологическими признаками функциональной активности. Выявляли лимфоциты с ровным, округлым или бобовидной формы эухроматиновым ядром и хорошо контурированным ядрышком. В цитоплазме отмечали выраженную ги-

перплазию протеинсинтетического аппарата, сочетающуюся с повышенной активностью клеточной поверхности. С высокой частотой встречались клетки со сложной формой ядра за счет извилистости его контуров, глубоких инвагинаций поверхности, расширения ядерных пор (рис. 1). Иногда в таких клетках наблюдали очаговое расширение перинуклеарного пространства, незначительную конденсацию хроматина.

Часто встречались клетки с поверхностными цитоплазматическими выростами. У больших и средних лимфоцитов они были конусовидной и булавовидной формы, у малых — в виде микроворсин. При количественном анализе установлено, что на поверхности больших лимфоцитов количество выростов составило $26,4 \pm 1,5$, средних — $19,6 \pm 0,5$, малых — $12,5 \pm 0,7$, в контроле (рис. 2) $23,1 \pm 0,6$; $18,1 \pm 0,4$ и $10,4 \pm 0,7$ соответственно ($p < 0,05$). Только для БГЛ не отмечено достоверного увеличения количества выростов на поверхности клеток.

В малых лимфоцитах встречалось сочетание длинных выростов на поверхности клеток и небольших электронно-прозрачных пузырьков, часто располагающихся у основания выростов. Отмеченные изменения в части клеток сопровождались вакуолизацией цитоплазмы, очаговым разрыхлением и микроклазматозом мембран. Существенные перестройки наблюдали в цитоплазматических органеллах: $83,17 \pm 2,34$ % митохондрий имели ортодоксальную и $16,83 \pm 39$ % конденсированную конфигурацию, в контроле эти показатели составили соответственно $93,8 \pm 3,01$ и $6,2 \pm 0,89$ % ($p < 0,05-0,01$). Часто регистрировали крупные митохондрии с расширенными межкристиными промежутками и очаговой гомогенизацией или дезорганизацией крист. Комплекс Гольджи в этих клетках был нередко гипертрофирован, а его элементы расширены.

В больших и средних лимфоцитах можно было наблюдать локальную концентрацию электронно-плотных гранул (ЭПГ), более четко прослеживающихся в БГЛ. Число гранул в БГЛ колебалось от единичных до 7—10, в контроле — от единичных до 12—16. Наряду со снижением количества типичных азурофильных гранул в клетках выявляли гранулы с зернис-

тым содержимым или пустые гранулы. В клетках, содержащих тельце Голла, также наблюдали уменьшение количества и размера гранул, дисагрегацию гранул, составляющих кластер.

Отмечали увеличение числа активных нейтрофилов с высоким содержанием гранул и мозаичностью гранулярного аппарата. В некоторых из них наблюдали признаки аутофагоцитоза, в фагоцитарных вакуолях находились небольшие участки цитоплазмы с ограничивающей мембраной. Ядра клеток были частично или полностью сегментированы, количество и характер распределения хроматина в ядре оставались типичными для зрелых нейтрофилов. Клеточная поверхность характеризовалась многочисленными микроворсинками, часто образующими замкнутые вакуоли (рис. 3).

Наряду с этим встречались клетки с частично или полностью опустошенными гранулами и сниженным количеством гликогеновых гранул, т.е. наблюдали активацию процессов дегрануляции. В значительной части нейтрофилов констатировали увеличение числа пиноцитозных вакуолей, скапливающихся в виде гроздьев у плазматической мембраны, набухание, разрыхление, просветление матрикса и деформацию гранул, что указывало на нарушение пиноцитоза, усиление дегрануляции и экзоцитоза. Наблюдали также гиперсегментацию ядер нейтрофилов и увеличение ядерной мембраны за счет разнообразных по форме и величине выростов, расширения ядерных пор и очаговое расширение перинуклеарного пространства.

При обследовании этих детей в возрасте 16—17 лет (2002—2004 гг.) продолжали обнаруживать ультраструктурные изменения в лимфоцитах и нейтрофилах. Отмечали большое разнообразие их субмикроскопической организации, свидетельствующее о выраженной морфологической гетерогенности этих клеток.

Изменения ультраструктуры во многом были аналогичны описанным ранее, однако имелись некоторые особенности. Прежде всего, продолжали отмечать изменения ультраструктуры ядер лимфоцитов: полиморфизм, повышенную извилистость контуров, нередко создающих на срезе впечатление явления фрагментации, очаговое расширение перинуклеарного простран-

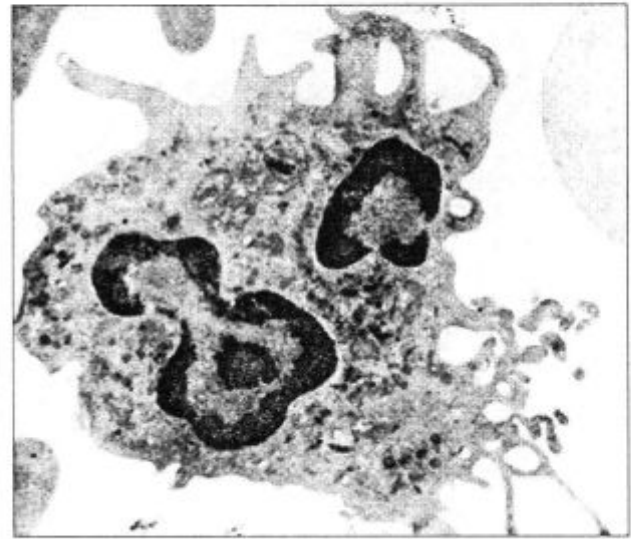


Рис. 3. Нейтрофил крови ребенка К., облученного внутриутробно. Обилие азурофильных и цинических гранул, наличие участков цитоплазмы с ограничивающей мембраной, многочисленные микроворсы и микроворсинки цитоплазмы. $\times 12\ 000$

ства, расширение пор, нарушение тинкториальных особенностей гетеро- и эухроматина. Однако поверхность лимфоцитов стала более «спокойной», снизилась численность микроворсинок. Значительно реже выявляли клетки с вакуолизацией цитоплазмы и клетки в виде «ручного зеркала». В клетках, содержащих тельце Голла, сохранялись выраженные изменения ЭПГ, сопровождающиеся нарушением строения гранул, их дисагрегацией, снижением числа гранул, составляющих кластер. Разнообразные изменения обнаруживали и в БГЛ. Наряду с клетками, содержащими небольшое количество ЭПГ и полиморфно-трубчатых структур, встречали клетки с их высоким содержанием. В цитоплазме отдельных клеток отмечали многочисленные цитолисомы и тубуло-ретикулярные структуры, в митохондриях — нарушение ортодоксального типа структуры с увеличением доли конденсированных форм и единичных миелиноподобных структур или набухших, с редукцией крист. Продолжали выявлять лимфоциты с эухроматиновым ядром, которые крайне редко обнаруживали в контроле (рис. 4).

Эти клетки имели овальную или неправильную форму, на плазматической мембране которых отмечали микроворсинки, мелкие ваку-

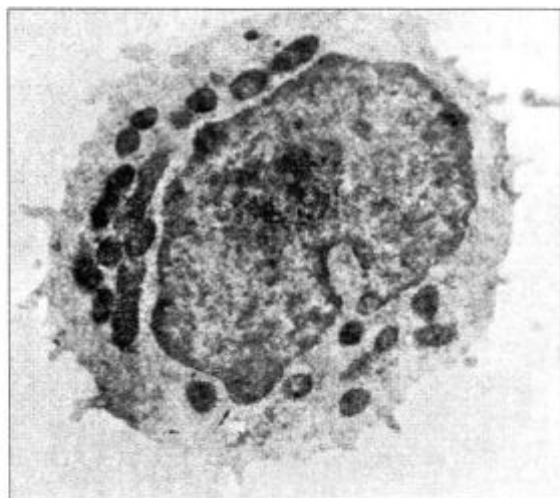


Рис. 4. Лимфоцит крови ребенка С., облученного внутриутробно. В центре — эухроматиновое ядро с крупным четко контурированным ядрышком. В цитоплазме — обилие митохондрий, разнообразных по структуре и форме, рибосомы и полисомы. $\times 13\ 500$

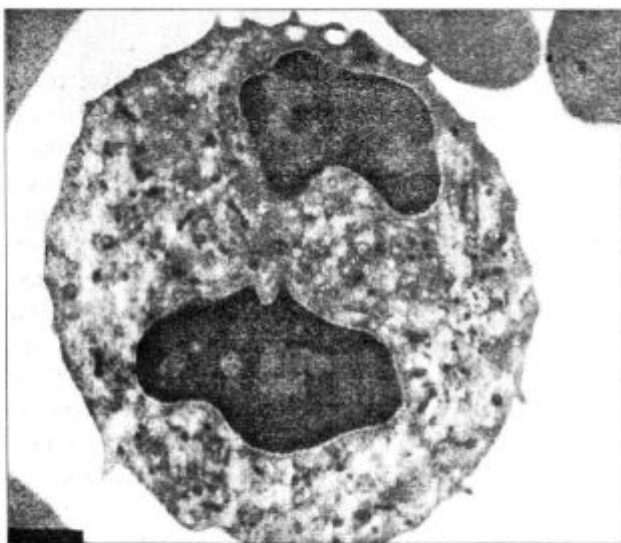


Рис. 5. Нейтрофил крови ребенка Д., облученного внутриутробно. Конденсация хроматина ядра, деструкция содержимого гранул. $\times 13\ 000$

оли у поверхности мембраны. Визуализировалось овальное, бобовидное или угловатое ядро с несколькими выемками, тонко диспергированным хроматином и узкой полоской гетерохроматина вдоль ядерной мембраны. Как правило, ядро содержало ядрышки, перинуклеарное пространство было очагово расширено и сообщалось с гранулярной эндоплазма-

тической сетью, ядерные поры расширены. В умеренной или широкой электронно-светлой цитоплазме встречали много рибосом и полисом, отмечался развитый комплекс Гольджи и много полиморфных митохондрий.

Количество нейтрофилов, которые можно рассматривать как инертные, а их ультраструктуру как вариант нормы, было значительно ниже, чем в контроле. Продолжали выявлять клетки с высоким содержанием гранул и мозаичностью гранулярного аппарата, в некоторых из них отмечали признаки дегрануляции и аутофагоцитоза. Ядра этих клеток частично или полностью сегментированы, количество и характер распределения хроматина в ядре были типичными для зрелых нейтрофилов. В части ядер наряду с увеличением ядерной поверхности за счет разнообразных по форме и величине выростов наблюдали очаговое расширение перинуклеарного пространства и конденсацию хроматина. В цитоплазме имелось небольшое количество типичных гранул, которые располагались между многочисленными запустевшими гранулами (рис. 5).

Таким образом, у детей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения в период внутриутробного развития и на последующих этапах онтогенеза, наблюдали существенные изменения ультраструктурной организации клеток крови в первые годы жизни. В динамике послеаварийного периода выраженность этих изменений уменьшилась, но не исчезла и в отдаленные сроки после аварии на ЧАЭС (2002—2004 гг.), когда дети достигли возраста 16—17 лет.

Выводы. У детей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения в период внутриутробного развития и на последующих этапах онтогенеза, выявлены существенные изменения ультраструктурной организации лимфоцитов циркулирующего пула: повышенная извилистость контуров ядра с расширением перинуклеарного пространства, повышение плотности митохондрий и дезорганизация крист, расширение просвета цистерн цитоплазматической сети, нарушение структуры электронноплотных гранул. Ультраструктура нейтрофилов характеризовалась очаговым расширением перинуклеарного пространства, уменьшением гликосом, нарушением структуры гранул, на-

lichem вакуолей, дегрануляцией цитоплазмы и гиперсегментацией ядер. В отдаленные сроки после аварии на ЧАЭС (2002—2004 гг.) продолжают выявляться аналогичные, хотя и менее выраженные, изменения ультраструктуры лимфоцитов и нейтрофилов. Выявленные изменения ультраструктурной организации клеток крови могут оказывать существенное влияние на выполнение ими специфических функций.

SUMMARY. The electron-microscopic examinations of lymphocytes and neutrophils in circulating blood of children irradiated during intrauterine development and on posterior stages of ontogenesis were performed in dynamics after accidental period. Some changes in lymphocyte ultrastructure were revealed namely the increased undulation of nuclear contours with dilated perinuclear space and some reconstructions of their cellular organoids (the increased density of mitochondrial matrix, crist disorganization, dilation of clear space in cisterns of cytoplasmic net, disorders in the structure of electron-dense granules). The peculiarities of neutrophile ultrastructure that are characterized by centre dilated perinuclear space, decrease in glycosomes, disorders in granular structure, vacuole presence, degradation of cytoplasm and nuclear hypersegmentation were determined.

РЕЗЮМЕ. В динаміці після аварійного періоду проведено електронно-мікроскопічні дослідження лімфоцитів та нейтрофілів циркулюючої крові у дітей, які зазнали впливу іонізуючого опромінення в період внутрішньоутробного розвитку та на наступних етапах онтогенезу. Виявлено ряд змін ультраструктури лімфоцитів: підвищення хвилястості контурів ядра з розширенням перинуклеарного простору, а також певні перебудови їх клітинних органодів, підвищення щільності мітохондрій та дезорганізація крист, розширення просвіту цистерн цитоплазматичної мережі, по-

рушення структури електронно-щільних гранул. Встановлено особливості ультраструктури нейтрофілів, які характеризуються осередковим розширенням перинуклеарного простору, зменшенням глікосом, порушенням структури гранул, наявністю вакуолей, дегрануляцією цитоплазми та гіперсегментацією ядер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Радиация и иммунитет человека* / Под ред. С.В. Комиссаренко и К.П. Зака. — Киев: Наук. думка, 1994. — 112 с.
2. *Степанова Е.И., Давиденко О.А.* Реакции повреждения и компенсации в гемопоэтических клетках детей при воздействии неблагоприятных факторов Чернобыльской аварии // Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевых поражениях: Тез. докл. X науч. конф. — СПб, 1992. — С. 182—184.
3. *Степанова Е.И., Давиденко О.А., Галичанская Т.Я., Моргуи В.Г.* Ультраструктура гемопоэтических клеток у детей из зоны радионуклидного загрязнения // Радиобиологические последствия аварии на Чернобыльской АЭС: Тез. докл. Всесоюз. конф. — Минск, 1991. — С. 131—132.
4. *Степанова Е.И., Вдовенко В.Ю., Кондрашова В.Г., Галичанская Т.Я.* Оценка отдаленных эффектов внутриутробного облучения детей в результате Чернобыльской катастрофы // Отдаленные медицинские последствия Чернобыльской катастрофы: Материалы 2-й Международ. конф. — Киев, 1998. — С. 376.
5. *Степанова Е.И., Давиденко О.А.* Реакции гемопоэтической системы детей на воздействие неблагоприятных факторов аварии // III Укр. з'їзд гематологів трансфузіологів: Тез. доп. (Суми, 23—25 травня 1995 р.). — Київ, 1995. — С. 134—135.
6. *Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. и др.* Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. — Киев: Наук. думка, 1974. — 247 с.

Поступила 15.08.05