



УДК 615.37:616-097+616.43

О. М. Климова, Л. А. Дроздова

ДІАГНОСТИЧНА ЗНАЧУЩІСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПОРУШЕНЬ, ЗМІН ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ Й ВМІСТУ СТЕРОЇДНИХ ГОРМОНІВ У ЛІКВІДАТОРІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС

Інститут загальної і невідкладної хірургії АМН України, Харків

Хронічне опромінення, що формується за рахунок впливу внутрішніх і зовнішніх джерел, і одноразове зовнішнє опромінення спричинюють в організмі цілий комплекс змін різних систем і органів.

Викликає інтерес вивчення перебігу післяпроменевого відновних процесів, що відбуваються на фоні регуляторного імунного і нейроендокринного дисбалансу, зумовленого гетерогенністю у відношенні радіочутливості, отже, й радіовразливості структур, що складають досліджувану систему [1; 2].

Як відомо, загальний рівень резистентності залежить від характеру імунонейроендокринних реакцій, які визначаються генетичним поліморфізмом і ступенем мутабельності генів. Спектр генетичної патології, в тому числі й у нейрогуморальній сфері, визначається мутаціями, що відбуваються на генному і хромосомному рівнях.

Незважаючи на те, що імунна система є автономною, вона перебуває під контролем ендокринних впливів. Вплив гормонів на імунну систему реалізується внаслідок взаємодії клітин імунної системи зі спе-

цифічними рецепторами і може бути прямим й опосередкованим [3]. Кортизол й інші гормони кори надниркових залоз у фізіологічних концентраціях інгібують проліферацію лімфоцитів, але, мабуть, сприяють їхньому диференціюванню, а у фармакологічних концентраціях спричинюють апоптоз лімфоцитів, але не макрофагів, обумовлюють перерозподіл лімфоцитів у організмі, посилюючи еміграцію клітин з кори тимуса і надходження Т-лімфоцитів у кістковий мозок. Особливе значення має здатність глюкокортикоїдів спричинювати апоптоз спочиваючих лімфоцитів. Стадії розвитку лімфоцитів, для яких характерна підвищена чутливість до індукції апоптозу глюкокортикоїдами, відповідають періодам негативної селекції — при формуванні антигенрозпізнавального рецептора Т-клітин у тимусі й при «дозріванні» гуморальної відповіді — добору клонів із найбільшою спорідненістю до антигену після періоду гіпермутабельності V-гена В-лімфоцитів. Верхня межа фізіологічних коливань кількості кортизолу в крові може спричинити апоптоз лімфо-

цитів на чутливій стадії розвитку [3].

Не з'ясований взаємозв'язок між ступенем мутабельності й змінами показників імунної та ендокринної систем.

Метою роботи було з'ясувати наявність можливого взаємозв'язку між ступенем мутабельності хромосом і зміною показників регуляторних систем організму — імунної та ендокринної — у ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС.

Матеріали та методи дослідження

Досліджено імунну відповідь і гормональний статус у 183 ліквідаторів аварії на ЧАЕС, які перебували у зоні підвищеної радіоактивності в різні періоди. У 57 осіб оцінювали частоту хромосомних аберацій. Обстежували контингент ліквідаторів, що перебували в зоні аварії в 1986 р. (середня індивідуальна доза — 12,1 сГр) віком від 28 до 46 років (1-ша група), і ліквідаторів, що перебували в зоні аварії в 1987 р. (середня індивідуальна доза — 7,1 сГр) віком від 31 до 47 років (2-га група), через 9 років після аварії на ЧАЕС. Особи, що перебували в зоні підви-



щеної радіації в 1986 р., піддавалися радіаційному впливу з усіх відкритих джерел радіоактивності і хімічних агентів (свинцю, продуктів горіння). За даними Е. В. Соботовича і співавторів, радіонуклідний і фазовий склад аварійного викиду Чорнобильської АЕС в 1986 і в 1987 рр. відрізнявся. Сумарний викид і активність основних радіонуклідів, вимірювана при радіометричних аналізах, варіювали [4].

Велике значення має вплив структурних цитогенетичних змін на різні ланки метаболізму, оскільки кількісно генна експресія може бути пов'язана не тільки з хромосомними абераціями, але й посттранскрипційними змінами, які виявляються в зміні активності ферментів і цитокінів, що призводить до розвитку метаболічних розладів.

У роботі використовували культуру лейкоцитів периферичної крові людини для проведення цитогенетичного аналізу, забарвлення хромосомних препаратів проводили за методом Романовського — Гімзи. Цитогенетичні дослідження проводили шляхом світлової мікроскопії. На кожен експериментальну точку аналізували по 50 хромосомних пластинок.

Визначення вмісту субпопуляцій CD3, CD4, CD8 Т-лімфоцитів проводили непрямим імунофлюоресцентним методом забарвлення клітин із використанням моноклональних CD-антитіл і FITC-кон'югованих козячих антитіл до мишачих імуноглобулінів (набір моноклональних і поліклональних антитіл для визначення субпопуляцій імунокомпетентних клітин. ТОВ «Сорбент», м. Подольськ, Московська обл.). Підрахунок позитивних клітин проводили за допомогою флюоресцентного мікроскопа.

Визначення вмісту аутоімунних антитіл до лімфоцитів (лімфоцитотоксичний тест) проводили модифікованим методом Тerasaki. Реакція здійснюється з використанням

виділених у градієнті щільності фікол-верографін лімфоцитів периферичної крові та сироватки крові однієї обстежуваної людини з додаванням до інкубованої суспензії кролячого комплементу. Оцінка реакції проводиться після забарвлення препарату через 18 год на світловому мікроскопі за співвідношенням мертвих клітин (забарвлених) і живих (незабарвлених).

Концентрацію циркулюючих імуних комплексів (ЦІК) визначали методом селективної преципітації комплексів антиген — антитіло в поліетиленгліколі з наступним фотометричним визначенням щільності преципітату. Константу ЦІК визначали методом, що ґрунтується на розрізненні преципітації комплексів у поліетиленгліколі різної концентрації [5].

Активність комплементу оцінювали за допомогою методу визначення споживання комплементу в реакції, що ґрунтується на феномені лізису еритроцитів у присутності гомологічних антитіл (гемолізинів) і комплементу.

Вміст IgE у сироватці крові визначали твердофазним імуноферментним методом, з використанням високоспецифічних моноклональних антитіл до IgE, виділених з культури клітин й іммобілізованих на кульках з полістиролу, і кон'югату антитіл бика до IgE з ензимом (набір реагентів EZ — BEAD™ IgE ENZYME IMMUNOASSAY KIT (Immunotech Corp. Boston).

Для визначення вмісту гормонів у сироватці крові використовували набори реактивів для радіоізотопного аналізу з використанням гормонів мічених ¹²⁵I і преципітуючого реагенту (розробник — Інститут біоорганічної хімії АН РБ, Мінськ).

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження показників імунної відповіді, частоти хромосомних аберацій і вмісту

гормонів були проведені у віддалений період (через 9 років) у ліквідаторів аварії на ЧАЕС, що перебували в різний термін у зоні підвищеної радіації, які зверталися в клініку ІОНХ АМНУ з приводу захворювань ШКТ (виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки), гриж, гіперплазії щитоподібної залози, паращитоподібних залоз і тимуса, атеросклерозу.

Імунну відповідь оцінювали за станом показників неспецифічної резистентності, клітинного і гуморального імунітету: активністю комплементу, співвідношенням субпопуляцій Т-лімфоцитів, рівнем і розмірами ЦІК, вмістом імуноглобуліну Е (IgE).

Дослідження довели зниження активності комплементу в осіб, які брали участь у ліквідації аварії в 1986 р., до $(0,70 \pm 0,13)$ у. о. (при $(1,12 \pm 0,20)$ у. о. в контрольній групі). В осіб, які перебували в зоні аварії в 1987 р., активність комплементу вірогідно не відрізнялася від даного показника в контрольній групі і становила $(0,90 \pm 0,18)$ у. о.

Зміни в клітинній ланці імунітету спостерігалися як у ліквідаторів 1986 р., так і в осіб, які перебували в зоні аварії в 1987 р. В осіб, які перебували в зоні аварії в 1986 р., виявили зниження імунорегуляторного індексу до $(0,95 \pm 0,20)$, за рахунок низького рівня CD4⁺ лімфоцитів, який становив $(11,7 \pm 5,1)$ %, що може свідчити про розвиток імунодефіцитного стану. У ліквідаторів, які перебували в зоні аварії в 1987 р., відзначали зниження рівня CD4⁺ і CD8⁺ субпопуляцій Т-лімфоцитів до $(15,4 \pm 6,2)$ і $(9,3 \pm 2,9)$ % відповідно. Імунорегуляторний індекс не відрізнявся від даного показника у контрольній групі і дорівнював $(1,65 \pm 0,42)$.

У групі осіб, які перебували в зоні аварії в 1986 р., виявили значне підвищення вмісту ЦІК — до $(100,3 \pm 18,2)$ од. Е при $(53,6 \pm 12,3)$ од. Е в конт-



рольній групі. У ліквідаторів, які перебували в зоні підвищеної радіоактивності в 1987 р., даний показник не відрізнявся від контрольних величин.

IgE, що характеризує наявність алергізації, у середньому був вище в ліквідаторів, які одержали дозове навантаження в 1987 р., і становив ($101,8 \pm 26,5$) МО/мл (при ($27,8 \pm 11,3$) МО/мл у контрольній групі). Також в осіб цієї групи значно підвищений рівень автоімунних антитіл — ($41,4 \pm 24,2$) % при значенні в контрольній групі — ($19,2 \pm 3,6$) %, що також характерно для алергічних та автоімунних процесів.

При аналізі отриманих даних основні групи обстежуваних класифікували на підгрупи залежно від характеру і спрямованості імунореактивності. Була виділена група осіб, які мають значні зміни в гуморальній ланці імунітету: підвищення концентрації ЦІК і зміна їхніх розмірів (молекулярної ваги), високий рівень автоімунних антитіл, підвищення вмісту IgE, при цьому показники клітинного імунітету були також підвищені або не відрізнялися від контрольних величин. Тип імунної відповіді, що характеризується даними змінами, визначили як гіперергічний. У частини ліквідаторів не виявили відхилень показників імунної відповіді порівняно з контрольною групою, їх було віднесено до нормотипу імунної відповіді. Ліквідатори, які мали знижену функцію клітинної ланки імунітету і знижений або нормальний рівень показників гуморальної ланки імунітету, були охарактеризовані як особи з гіпотипом імунної відповіді. У частини обстежених низька функціональна активність клітинних субпопуляцій супроводжувалася підвищенням рівнем показників гуморального імунітету, дані особи були зараховані до групи зі змішаним типом імунної відповіді.

Мутабельність геному в ліквідаторів аварії на ЧАЕС

оцінювали за результатами цитогенетичних досліджень безпосередньо після перебування в зоні аварії. Виявили, що в частини ліквідаторів із захворюваннями ШКТ спостерігалось максимальне збільшення частоти хромосомних аберацій — 11 % на одну метафазну пластинку (поодинокі та парні фрагменти). У віддалений період, через 7 років після аварії, у ліквідаторів відбувається елімінація хромосомних аберацій, їхня частота в середньому дорівнює 3,4 %. Порівняльний аналіз рівня хромосомних аберацій у групах із різним характером імунної відповіді довів, що в осіб із гіпоергічним типом імунореактивності у віддалений період після участі в ліквідації аварії спостерігається збільшена частота хромосомних аберацій, що становить ($5,4 \pm 0,4$) %, тимчасом як у осіб із гіперергічним типом імунореактивності даний показник підвищений незначно і дорівнює ($1,3 \pm 0,2$) %.

Фенотипічні прояви хромосомної нестабільності могли однаковою мірою виявлятися як метаболічні порушення в деяких пацієнтів, включаючи зміну концентрації гормонів, а також як стійкі імунопатологічні стани.

Результати дослідження вмісту гормонів у ліквідаторів, що знаходилися у зоні аварії в різні періоди, які мають різні типи імунної відповіді, довели, що в осіб, які перебували в зо-

ні аварії в 1986 р. і мають гіперергічний і нормоергічний типи імунної відповіді, значне підвищення прогестерону ($12,06$ нмоль/л і $14,7$ нмоль/л відповідно) супроводжується зниженням вмісту тестостерону.

У ліквідаторів даної групи, що мають гіпоергічний тип імунної відповіді, спостерігали виражену зміну концентрації обох досліджуваних стероїдних гормонів. Вміст прогестерону був підвищений до $20,6$ нмоль/л (при $3,1$ нмоль/л у контрольній групі), тестостерону — до $24,5$ нг/мл (при $6,9$ нг/мл у контролі) (рис. 1).

У ліквідаторів аварії, які знаходилися в зоні підвищеної радіоактивності в 1987 р., що мають гіперергічний і гіпоергічний типи імунної відповіді, відзначали значне підвищення вмісту прогестерону і тестостерону. Так, у групі з гіперергічним типом імунореактивності вміст прогестерону підвищений у $5,8$ разів порівняно з контрольною групою, при цьому вміст тестостерону перевищував контрольні величини вдвічі.

У ліквідаторів зі зниженою імунореактивністю вміст прогестерону підвищений утричі, а величина тестостерону перевищує контрольне значення майже в 5 разів (рис. 2).

Відомо, що збільшення продукції андрогенів пов'язане з підвищенням активності кори надниркових залоз, тому нами був вивчений рівень кортизо-

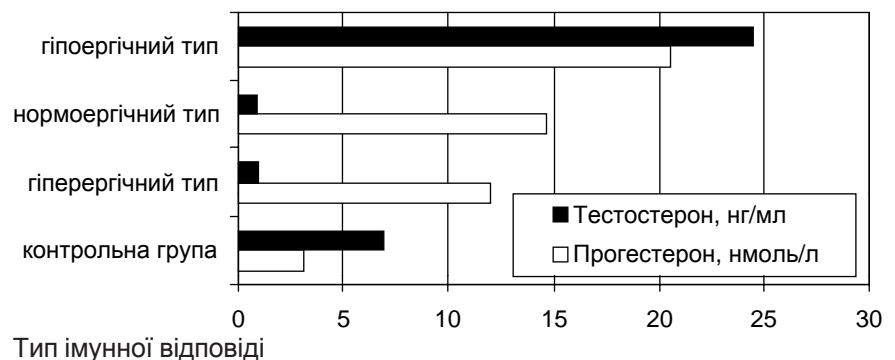


Рис. 1. Зміна вмісту стероїдних гормонів прогестерону і тестостерону в ліквідаторів аварії на ЧАЕС з різним типом імунної відповіді, які перебували в зоні аварії в 1986 р.



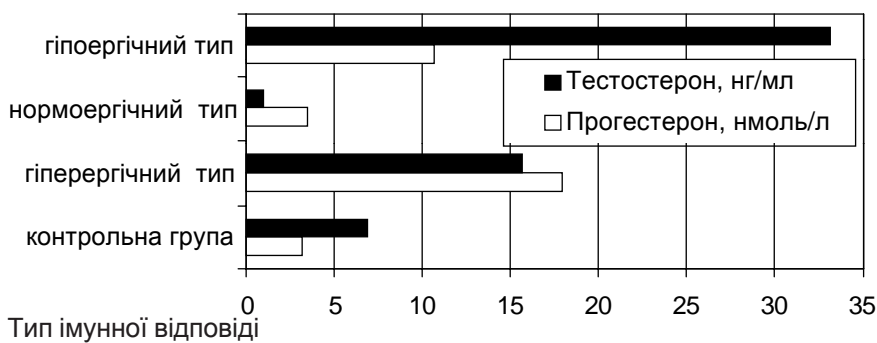


Рис. 2. Зміна вмісту стероїдних гормонів прогестерону і тестостерону в ліквідаторів аварії на ЧАЕС з різним типом імунної відповіді, які перебували в зоні аварії в 1987 р.

лу. Дослідження показали, що поряд із підвищеним рівнем прогестерону і тестостерону в ліквідаторів із гіпотипом імунної відповіді спостерігається підвищення вмісту кортизолу до 887,4 нмоль/л, що перевищує величину цього гормону в контрольній групі. Зниження імунореактивності поряд із підвищеним рівнем кортизолу узгоджується з даними деяких авторів про вплив кортикостероїдних гормонів і стресу на міграцію Т- і В-лімфоцитів.

За даними літератури, введення мишам гідрокортизону ацетату малими дозами спричинює гальмування міграції Т-клітин із вилочкової залози і пригнічення міграції В-клітин із кісткового мозку [6]. Цей гормон здатний пригнічувати активацію лімфоїдних клітин при імунній відповіді та блокувати міжклітинні взаємодії, знижуючи експресію генів ІЛ-2 та інших інтерлейкінів. Про існування впливу гормонів цієї групи на імунну систему свідчить ефект адреналектомії: збільшення (нерізка виражене) маси лімфоїдних органів, особливо тимуса, і посилення різних форм імунної відповіді. Ефект, аналогічний проявам гіперкортицизму, досягається при стресі. Хронічний стрес призводить до зниження стійкості до інфекційних агентів, включаючи віруси [3].

Вивчення рівня пролактину в ліквідаторів у віддалений період засвідчило зниження рівня даного гормону в осіб із гі-

потипом імунних реакцій, які знаходилися в зоні аварії в 1986 р., до $(60,3 \pm 12,5)$ мкМО/мл. В обстежених, які перебували в зоні аварії в 1987 р. і також характеризуються гіпоергічним типом імунореактивності, він наближений до нижньої межі норми і становить $(113,3 \pm 21,2)$ мкМО/мл. Відомо, що виражений пригнічуючий ефект на секрецію пролактину справляють дофамін, норадреналін, ацетилхолін. У ліквідаторів, що увійшли до інших груп, змін у рівні пролактину не спостерігали.

Дослідження вмісту тиреоїдних гормонів тироксину (T_4), трийодтироніну (T_3), а також тиреоглобуліну в ліквідаторів аварії на ЧАЕС через 6 років після іонізуючого впливу не виявило статистично вірогідних відмінностей від вмісту даних показників у контрольній групі.

Висновки

1. У ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС виявлено 4 типи імунореактивності залежно від рівня показників клітинно-го і гуморального імунітету.

2. В осіб із гіпоергічним типом імунореактивності у віддалений період після участі в ліквідації аварії спостерігається збільшена частота хромосомних аберацій, яка становить 5,4 %.

3. У ліквідаторів аварії на ЧАЕС виявлено зміну вмісту статевих гормонів і гормонів

кори надниркових залоз при вираженій імуносупресії та цитогенетичних порушеннях.

4. У ліквідаторів, які перебували в зоні аварії в 1986 р., що мають гіперергічний і нормоергічний типи імунної відповіді, спостерігається значне підвищення прогестерону, яке супроводжується зниженням вмісту тестостерону у віддалені періоди після радіаційного впливу.

5. У віддалений період у ліквідаторів аварії, які перебували в зоні підвищеної радіоактивності в 1987 р., виявили підвищення вмісту прогестерону, тестостерону і кортизолу на фоні значного пригнічення експресії диференціальних рецепторів $CD4^+$ і $CD8^+$ Т-лімфоцитів (гіпотип імунореактивності).

6. Ступінь виразності імунного і гормонального дисбалансу асоційований із високим ступенем мутабельності хромосом, який, у свою чергу, залежить від індивідуальної чутливості до впливу іонізуючого опромінення в ліквідаторів аварії на ЧАЕС.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алесина М. Ю., Рясенко В. И., Рымаренко П. И. Радиобиологические эффекты в различных органах и тканях животных в зоне радионуклидного загрязнения в результате аварии на ЧАЭС. — Чернобыль: НПО «Припять», 1994. — 67 с.
2. Горбань Е. М., Топольнікова Н. В. Вплив іонізуючого випромінювання на нервову регуляцію кори надниркових залоз та підшлункової залози // Укр. радіол. журнал. — 2002. — № 10. — С. 163-166.
3. Ярилин Я. Я. Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1999. — С. 370.
4. Соботович Э. В., Бондаренко Г. Н., Кононенко Л. В. Радиогеохимия в зоне влияния Чернобыльской АЭС. — К.: Наук. думка, 1992. — 143 с.
5. Константинова Н. А., Лаврентьев В. В., Побединская Л. К. Определение концентрации и молекулярной массы циркулирующих иммунных комплексов // Лаб. дело. — 1986. — № 3. — С. 161-165.
6. Контроль и регуляция иммунного ответа / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, В. М. Маньков, А. А. Михайлова. — Л.: Медицина, 1981. — 312 с.

