

УДК 612+616.092+616.15

Н.В. АКУЛИЧ, Н.Г. КРУЧИНСКИЙ, А.В. СОРОКА

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОПОГРАФИЯ ЛИМФОЦИТОВ У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ НИЗКОУРОВНЕВОМУ ИОНИЗИРУЮЩЕМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

Согласно нашим данным у различных категорий населения, подвергшихся низкоуровневому радиационному воздействию, отмечено увеличение тромбогенного риска, связанное со смещением гемостазиологического баланса. [1]. В частности, зафиксирована функциональная активация сосудисто-клеточного звена гемостаза, ухудшение реологических свойств крови [1]. Кроме того, нами установлена корреляционная связь между уровнем про-

воспалительных цитокинов и состоянием интерфазного хроматина иммунокомпетентных клеток [1].

Принято считать, что воздействие низкоуровневого ионизирующего воздействия может индуцировать гибель лимфоцитов периферической крови по типу апоптоза. В тоже время, дисрегуляция апоптоза может закончиться воспалительными, злокачественными, аутоиммунными и нейродегенеративными болезнями.

Морфоденситометрические показатели (МДМ), описывающие структуру интерфазного хроматина (ИХ) клеток, позволяют оценить морфофункциональное состояние эпигенома в ядре единичных клеток. Кроме того, с помощью данной методики можно установить маркеры различных патологических состояний [2]. Все вышесказанное и определило нашу задачу: оценить структурно-функциональное состояние интерфазного хроматина ядер лимфоцитов у пациентов подвергшихся низкоуровневому радиационному воздействию.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основная группа сформирована из 17 пациентов, 10 из которых являлись ликвидаторами аварии на ЧАЭС, 7 постоянно проживают на территории, загрязненность которой по ^{137}Cs составляет 5-7 $\text{Ки}/\text{км}^2$, 10 пациентов с атеросклерозом составили контрольную группу.

Структурно-функциональное состояние иммунокомпетентных клеток (ИКК) оценивалось методом компьютерной морфоденситометрии (КМДМ) [3].

Технология КМДМ реализована на аппаратно-программном комплексе «Диаморф» (фирма «Диаморф», Москва). Исследовались ядра лимфоцитов в стандартных мазках на предметных стеклах, обработанных РНК-азой в растворе сахарозы и окрашенных галлоцианин-хромовыми квасцами и заключенных в *Canadian balsam*.

В данном исследовании для каждой компоненты оценивались следующие морфоденситометрические параметры:

N – количество гранул хроматина в компоненте

AREA – площадь гранул компоненты

SAREA – площадь компоненты

PER – периметр гранул компоненты

IOD – интегральная оптическая плотность

OD – оптическая плотность

STDOD – контрастность компоненты

IZ – изрезанность (расчетный параметр, $IZ = PER/AREA$)

AREA3 – площадь $q3$ ($AREA3 = (AREA1 + AREA2 + AREA4)/AREAN$)

OTN – отношение площади плотного хроматина к площади рыхлого (расчетная величина) $(AREA1 + AREA2)/(AREA3 + AREA4)$

Кроме того, определялись классические морфометрические параметры:

AREAN – площадь ядра

PERN – периметр ядра

IODN – интегральная оптическая плотность ядра

ODN – оптическая плотность ядра

STDODN – контрастность ядра

Статистическая обработка полученных результатов включала в себя следующие этапы:

1) Исследование нормальности распределения генеральной совокупности по каждому числовому ряду по критерию Колмогорова-Смирнова λ с оценкой значимости различий в форме эмпирического и теоретического распределений.

2) Достоверность различий выборок устанавливались с помощью критерия t Стьюдента, критерия знаков, критерия U Манна-Уитни, критерия Вальда-Вольфовица.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние ИХ лимфоцитов периферической крови приведены в таблице 1 и 2.

Таблица 1

Морфоденситометрические параметры
интерфазного хроматина лимфоцитов
у опытной и контрольной групп

МДМ параметр	Основная группа ($\bar{X} \pm S_x$) n=17	Контрольная группа ($\bar{X} \pm S_x$) n=10
Q1		
N1	9.12±0.5	11.5±1.07
AREA1	91.52±11.78	91.02±22.35
SAREA1	830.93±91.83	958.45±108.62
PER1	33.99±3.15	33.93±5.70
IOD1	1124.23±182.85	1138.73±360.99
OD1	11.14±0.33	11.35±0.49
STDOD1	0.50±0.004	0.49±0.08
Q2		
AREA2	412.08±67.51	396.13±63.40
SAREA2	1432±43.8	1654±144
PER2	276.37±47.93	268.72±64.22
IOD2	4461.18±802.51	4373.09±944.49
OD2	9.76±0.34	9.98±0.58
STDOD2	0.57±0.05	0.64±0.12
Q4		
AREA4	93.02±8.14	77.59±8.70
SAREA4	947.02±80.10	963.35±129.86
PER4	36.84±2.37	32.27±2.63
IOD4	721.41±40.49	631.36±44.24
OD4	8.47±0.32	8.65±0.53
STDOD4	0.49±0.02	0.52±0.03
Ядро		
AREAN	5070.07±139.29	5480.40±355.86
PERN	264.11±3.77	275.30±10.02
IODN	46614.61±976.75	51943.47±1642.47
ODN	9.33±0.35	9.62±0.58
STDODN	1.85±0.12	1.98±0.23
IZ1	0.39±0.01	0.39±0.02
IZ2	0.65±0.02	0.14±0.01
IZ4	0.41±0.01	0.42±0.01
IZN	0.05±0.00	0.05±0.00
OTN	0.88±0.08	0.96±0.12

Как следует из представленных данных, ядра лимфоцитов в основной группе имеют значимо меньший периметр и интегральную оптическую плотность (рис.).

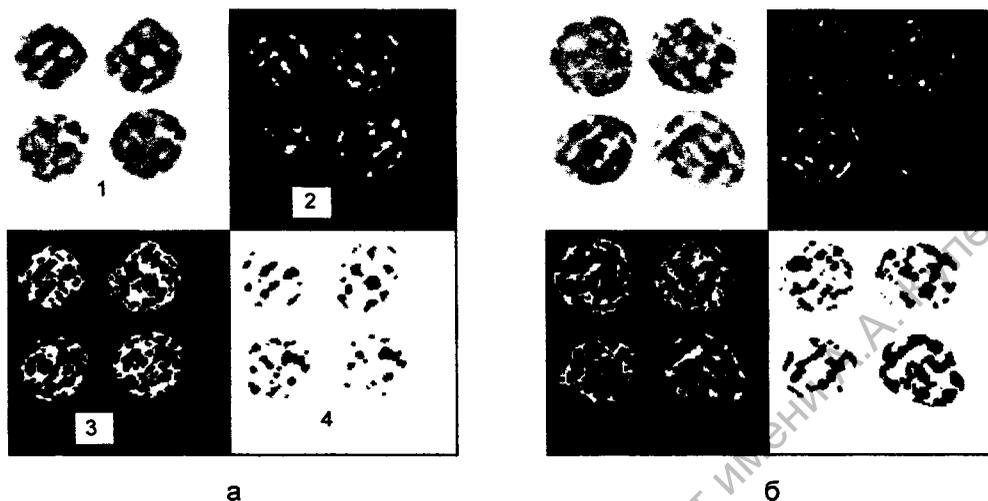


Рис. 1. Оптико-геометрический анализ изображения лимфоцитов периферической крови в контрольной (а) и основной (б) групп: 1 – улучшенное изображение (применение математических фильтров) ядер лимфоцитов, 2 – гранулярный гетерохроматин, 3 – перигранулярный гетерохроматин, 4 – эухроматин.

В лимфоцитах основной группы в гетерохроматиновых областях ядер лимфоцитов обнаружены следующие различия по сравнению с контрольной группой:

- снижение дисперсности и увеличение контрастности гранулярной компоненты $q1$ в лимфоцитах опытной группы;
- снижение суммарной площади и периметра перигранулярной зоны $q2$, увеличение ее изрезанности в 4.5 раза по сравнению с контролем.

Эухроматиновые области ядер лимфоцитов в группах сравнения различаются незначительно. Так, дисперсность компоненты $q4$ у основной группы достоверно ниже, чем в контроле. Остальные МДМ параметры ИХ хроматина в обеих группах статистически значимо не различаются.

Достоверные различия МДМ параметров ИХ лимфоцитов у пациентов подвергшихся низкоуровневому радиационному воздействию и контрольной группой приведены в таблице №2.

В классической цитологии выделяют два типа хроматина: эухроматин – плотность упаковки которого в интерфазе составляет 1000-2000, а во время митоза он конденсируется в 5-10 раз, и гетерохроматин – нити которого по плотности напоминают митотические хромосомы. Через состояние «эухроматин и гетерохроматин», не прерываясь, проходят одни и те же фибриллы. Из этого следует, что эти состояния хроматина представляют собой различную степень конденсации одного и того же генетического материала.

Обнаруженный в наших экспериментальных исследованиях феномен активации, свидетельствующий о нарастании транскрипционной активности, возможно, является маркером структурно-функциональных перестроек хроматина лимфоцитов у жителей, подвергшихся низкоуровневому радиационному воздействию [2]. Кроме того, в некоторых ядрах лимфоцитов периферической крови выявлен феномен маргинального расположения гетерохроматина, что является признаком проявления апоптоза.

Таблица 2

МДМ параметры интерфазного хроматина лимфоцитов
у опытной и контрольной групп

МДМ параметр	Основная группа ($\bar{X} \pm S_x$) n=17	Контрольная группа ($\bar{X} \pm S_x$) n=10	Тест проверки достоверности различий	Достоверность различий (p)
Q1				
Количество гра- нул хроматина	9.12±0.5	11.5±1.07	Манна-Уитни, z=2.18	0.03
Контрастность компоненты	0.50±0.004	0.49±0.08	Вальда- Вольфовица, z=2.7	0.007
Q2				
Площадь компо- ненты	1432±43.8	1654±144	Манна-Уитни, z=2.04	0.04
периметр компо- ненты	927.9±23.6	1059±49	Манна-Уитни, z=2.22	0.03
Изрезанность компоненты	0.653±0.02	0.143±0.01	Стьюдента, t=15.2	<0.0001
Q4				
Количество гра- нул хроматина	10.3±0.58	12.3±0.7	Манна-Уитни, z=2.08	0.04
Ядро				
Периметр	264.1±3.78	275±10	Вальда- Вольфовица, z=2.08	0.04
Интегральная оптическая плот- ность	46615±976.8	51943±1642	Стьюдента, t=2,79	0.012

Показано [4], что лимфоциты, подвергшиеся радиационному воздействию низкой интенсивности, экспрессируют на своей поверхности *Fas*-антиген (маркер апоптоза). Данные факты в совокупности с нашими данными свидетельствуют о том, что в результате воздействия ионизирующей радиации происходит активация сигнальных путей апоптоза.

Выявленные особенности эпигенетической топографии интерфазного хроматина лимфоцитов периферической крови способствуют более детальному пониманию изменений, происходящих в организме лиц, проживающих в экологически неблагоприятных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Role Of Cytokines And Cell Adhesion Molecules In Pathogenesis Of The Atherosclerosis At The Patients With Ischemic Heart And Brain Diseases Exposure By Ionizing Radiation After The Chernobyl Catastrophe / *Kruchinsky N.G., Teplyakov A.I. Akulich N.V.* et al. // INTERNATIONAL ECOLOGIC FORUM "ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH" Saint Petersburg, Russia June 29th - July 2nd, 2003. – b7211a72.
2. Image Analysis of Chromatin In Peripheral Blood Lymphocytes And Neutrophil At The Atherosclerosis / *Akulich N.V., Kruchinsky N.G., Teplyakov A.I.* et al. // INTERNATIONAL ECOLOGIC FORUM "ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH" Saint Petersburg, Russia June 29th - July 2nd, 2003. – b327t3a2.
3. *Жукоцкий А.В.* Дисс. д-ра м. н.: 14.00.23, 03.00.02. – М., 1992. – 496 с.
4. *Солнцева О.С., Калинина Н.М., Бычкова Н.В.* и др. // Иммунология. – 2000. – № 3. – С. 22-24.

SUMMARY

The prior investigations have shown the increase of thrombosis risk in atherosclerosis in patients, chronically affected by low-level radiation. This was related to platelet hemostasis activation, hypercoagulable state, hemorheologic abnormalities (lower red blood cells flexibility, higher aggregation and increase of whole blood and/or plasma viscosity at high and low shear rates). These hemostaseologic and rheologic features were independent from atherosclerotic localization, reflected the systemic character of atherosclerotic process.

Object of research 10 patients were «liquidators» of Accident on Chernobyl Nuclear Power Plant in 1986, 7 patients - inhabitants from territories, contaminated ^{137}Cs with level more $5 \text{ Ku}/\text{km}^2$ (a main group). Other 10 patients without additional low-level radiation exposure comprised a control group.

The method of morphodensitometry gives the possibility to study different cytoiological objects on a new quality level. Computational analysis of the TV image was performed by means of «DiaMorph» (Russia) – system combined with the microscopes «ZEISS» (Germany).

The computer image processing reveals an inside structure of the object which allows to research different type of cells on supramolecular level. We used a median filtration, linear median contrast, gauss transformation for analysis of topology supramolecular structure of chromatin. The chromatin network was recovered as a graphical drawing that connected maximal optical density on single vectors of TV scans.

Analysis of an interphase chromatin in patients with an atherosclerosis has shown, that nucleus of lymphocytes at patients with in atherosclerosis have smaller perimeter ($p < 0.05$) and optical density ($p < 0.05$). Differences were found in patients of the basic group in heterochromatin areas of nucleus of lymphocytes: decrease of granular components dispersity, but increase of its contrast; decrease of the general area and perimeter of perigranular zone. Changes of the parameters describing a state of perigranular zone, is a marker of structurally functional rearrangements of a chromatin of the lymphocytes connected with in low-level irradiation.