

*О.М.Грובה, А.Г.Чучалин, В.П.Черников, А.Л.Черняев, С.В.Буравков,  
А.В.Марачева, В.Г.Тупикин*

**ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ, УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
И РЕНТГЕНСПЕКТРАЛЬНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ  
БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНЫХ СМЫВОВ ЛИКВИДАТОРОВ  
ПОСЛЕДСТВИЙ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АТОМНОЙ  
ЭЛЕКТРОСТАНЦИИ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ  
(ПЕРВОЕ СООБЩЕНИЕ)**

НИИ пульмонологии МЗ РФ, НИИ морфологии человека АМН РФ

**RADIATION-INDUCED BIOCHEMICAL CHANGES IN BLOOD CELLS AND  
BAL FLUID OF THE PEOPLE, AFFECTED BY LOW DOSE OF IRRADIATION  
DURING THE CHERNOBYL KATASTROPHE, DISCOVERED BY THE ELECTRON SPIN  
RESONANCE METHOD**

*O.M.Grobova, A.G.Chuchalin, L.M.Bayder, V.L.Shargin, N.L.Sakina,  
A.E.Dontsov, M.E.Kudryavtsev, M.K.Pulatova*

**S u m m a r y**

Bronchoalveolar lavage (BAL) of 9 young men who took an active part in the liquidation of the Chernobyl wreck's consequences during may—july 1986 was analyzed in order to investigate: absolute and different cell count; b) possible presence of the radioactive particles in the cytoplasm of alveolar macrophages; c) chemical structure of these particles. Control group — 8 men without lung diseases. Whole absolute cell count in the liquidators BAL was greatly increased in comparison with control group ( $0,9 \pm 0,01 \cdot 10^6$  /ml and  $0,2 \pm 0,03 \cdot 10^6$  / ml in control group) but different cell number was not different from healthy subjects. Cytoplasm of 30—60% of alveolar macrophages contained large (0,5—1,0 mkm in diameter) high density particles. Chemical analysis of these particles was performed by the method of X-ray spectrometry with accelerating tension 80 kV, sensitivity of the channel — 40V and number of channels — 1024. Only cytoplasm and part of the high density particles in alveolar macrophages from liquidators contained U, Np, Pu, Fr, Pm, Pa. Cytoplasm of lymphocytes and erythrocytes of these patients, nets, buffers and epon for electron microscopy didn't contained such kind of the elements. Thus, it was determined that alveolar macrophages can take part in the deposition of actually insoluble radioactive dust particles and parts of nuclear fuel.

**Р е з ю м е**

Проведен анализ бронхоальвеолярных смывов (БАС) 9 молодых мужчин, которые принимали активное участие в ликвидации последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции в мае—июле 1986 года. Целью исследования было: изучение абсолютного и относительного количества клеточных элементов; возможное обнаружение радиоактивных включений в цитоплазме альвеолярных макрофагов; исследование химической структуры этих возможных включений. Абсолютное количество клеток в БАС ликвидаторов было значительно повышено по сравнению с контролем ( $0,6 \pm 0,01 \cdot 10^6$ /мл при  $0,2 \pm 0,03 \cdot 10^6$ /мл в контроле), однако доля различных клеточных элементов не отличалась от таковых у здоровых лиц. В цитоплазме 40% альвеолярных макрофагов обнаружены крупные (0,5—1,0 мкм в диаметре) оптически плотные частицы. Химический анализ этих включений проводили при помощи метода рентгеновской спектрометрии при усиливающем ускорении 80 kV, чувствительности каналов — 40 V и общем количестве каналов — 1024. Только цитоплазма и часть оптически плотных включений в альвеолярных макрофагах ликвидаторов содержала U, Np, Pu, Fr, Pm, Pa. Цитоплазма лимфоцитов и эритроцитов этих пациентов, а также электронно-микроскопические сеточки, использованные буферы и заливочные смолы не содержали этих элементов. Таким образом, было выявлено, что альвеолярные макрофаги могут принимать участие в депонировании труднорастворимых компонентов радиоактивной пыли и компонентов ядерного топлива.

Отличительной чертой аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) было сочетанное воздействие внешней проникающей радиации и радионуклидов, попавших в легкие людей в виде радиоактивных аэрозолей. При этом метеоусловия, сложившиеся после аварии (сухая, жаркая погода), способствовали тому, что радиоактивные вещества попадали в легкие как в виде аэрозолей, так

и на поверхности частиц пыли. Кроме того, в результате повреждения реактора в атмосфере оказались частицы топлива, конструкционных материалов здания станции [1,11]. Все вышеперечисленные частицы также могли адсорбировать на своей поверхности радиоактивные вещества из состава собственно аэрозолей [11]. Естественно, в большей степени этому воздействию подвергались

люди, участвовавшие в ликвидации последствий аварии, так называемые «ликвидаторы» [4,6]. У лиц, погибших в первые дни после аварии в ткани легких были обнаружены радиоактивные, так называемые «горячие частицы», обладающие  $\alpha$ - и  $\beta$ -излучением [11,18], подобно обнаруженным в экспериментах на животных при ингаляционном введении в легкие радионуклидов [3,5,17].

Вопрос о динамике накопления, распределения и выведения аэрозольных радионуклидов хорошо изучен и обобщен [9]. В настоящее время установлено, что в респираторные отделы легких проникают лишь частицы размерами от 0,2 до 1,0 мкм [10,11]. Более крупные частицы оседают на поверхности слизистой оболочки воздухоносных путей и выводятся при помощи мукоцилиарного клиренса [3,9]. Более того, обнаружены убедительные данные, что частицы, попавшие в респираторные отделы легких, достаточно быстро из них выводятся [14]. Важное место в процессах элиминации радиоактивных частиц отводят альвеолярным макрофагам (АМ), которые, например, могут трансформированные частицы  $^{241}\text{Am}$  внутри лизосом, включать ферритина, который затем выделяется из АМ и может проникать через межальвеолярные перегородки в виде трансферрина или в виде низкомолекулярной формы [15]. Поэтому уже на 200-е сутки эксперимента в паренхиматозных отделах легких остается менее 10% от ингаляционной дозы [14]. Однако в этих исследованиях изучена лишь динамика собственно радиоактивных аэрозолей. Особенностью же частиц, попавших в легкие людей после аварии на ЧАЭС, является, как указывалось выше, большое количество практически нерастворимых компонентов [7]. Для пневмокониозов, характеризующихся накоплением в респираторной части легких плохо растворимых частиц, показана возможность обнаружения ингаляционных частиц в цитоплазме АМ много лет спустя после прекращения контакта с поллютантами [19]. С этой точки зрения, чрезвычайно важно было изучить возможность обнаружения ингаляционных частиц в цитоплазме АМ ликвидаторов и изучить их химическую структуру.

Поэтому целью настоящей работы явилось цитологическое, ультраструктурное и рентгено-спектральное исследования бронхоальвеолярных смывов ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС в отдаленные сроки.

Данная работа — это часть комплексной программы по диагностике аэрозольных поражений органов дыхания у ликвидаторов аварии на ЧАЭС, выполнение которой началось в апреле 1993 года. В НИИ пульмонологии МЗ РФ (Москва) были разработаны следующие критерии отбора лиц, участвовавших в ликвидации аварии на ЧАЭС:

- отсутствие жалоб и клинико-лабораторных данных, указывающих на наличие заболеваний органов дыхания до работ на промплощадке ЧАЭС;
- работа на промплощадке ЧАЭС не менее одного месяца;
- участие в ликвидации завалов строительного мусора в непосредственной близости и на крыше

4-го энергоблока ЧАЭС, в погрузке разрушенных конструкций и земли;

— нерегулярное и неточное соблюдение правил личной безопасности (использование респираторов);

— отсутствие других пневмотропных профессиональных факторов воздействия на легкие до и после работ на промплощадке ЧАЭС.

На основании такого отбора были обследованы 9 мужчин ликвидаторов последствий аварии, курильщиков, жителей Владимирской области в возрасте 33-43 лет, работавших на промплощадке станции и на дезактивации транспорта в мае—сентябре 1986 года. При помощи общеклинических методов обследования у всех ликвидаторов был верифицирован диагноз хронического обструктивного бронхита в стадии ремиссии, диффузного пневмосклероза и эмфиземы легких. Во время диагностической фибробронхоскопии под местной анестезией 2% раствором лидокаина всем обследованным был выполнен бронхоальвеолярный смыв (БАС) по общепринятой методике [16]. Дробно, по 50 мл, вводили апиrogenный подогретый до 37°C изотонический раствор NaCl, приготовленный для внутривенного введения. Общее количество введенной жидкости составляло 250 мл. В качестве материала для исследования использовали 2—5 порций. Пробирочным методом в камере Горяева проводили подсчет абсолютного числа клеток в 1 мл (цитоз) и определяли жизнеспособность клеток (в 0,1% растворе трипанового синего и эозина). Затем жидкость БАС центрифугировали в пластиковых ареактогенных пробирках при 1500 об/мин и температуре +4°C в течение 10 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в сбалансированном солевом растворе Хенкса или 199 культуральной среде и доводили до концентрации клеточной взвеси  $2 \cdot 10^6$ /мл. Из 0,1 мл клеточной взвеси готовили мазки. В мазках, окрашенных по Романовскому—Гимзе, проводили подсчет относительного числа различных клеток БАС. Кроме того, подсчитывали относительное число малых (до 10 мкм в диаметре), средних (от 10 до 15 мкм в диаметре) и крупных (более 15 мкм в диаметре) форм АМ, а также долю АМ, содержащих инородные частицы в цитоплазме. При цитобактериоскопическом исследовании мазков, окрашенных по Граму, выявляли вид микроорганизмов, лежащих вне- и внутриклеточно [2].

Для трансмиссионной электронной микроскопии оставшийся осадок клеток БАС фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4). Постфиксацию проводили 1% раствором  $\text{OsO}_4$  на изотоническом фосфатном буфере (рН 7,2) в течение 60 минут; контрастирование — 2% водным раствором уранилацетата в течение 60 минут. Затем взвесь клеток БАС обезвоживали в ацетонах восходящей концентрации. Часть клеток заливали в эпоксидные смолы, готовили ультратонкие срезы. Срезы анализировали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100CX (Япония). На полученных фотографиях вычисляли диаметр инородных частиц в АМ, а с помощью 6-угольной сетки вычисляли объемную плотность инородных частиц в цитоплазме.

С помощью приставки «Link» к электронному микроскопу проводили качественный рентгено-спектральный микроанализ химических элементов в автоматическом режиме при ускоряющем напряжении 80 кВ, чувствительности канала 40 эВ, при 1024 каналах. Перед поиском по программе «Quantem» проводилась калибровка по O-строю и пику Cu (K,L) [8]. Исследовали взвеси фиксированных в глютаральдегиде клеток БАС, нанесенных на подложки, клеток БАС в ультратонких срезах, а также для контроля метода — использованных серийных сеточек для электронной микроскопии, фосфатного буфера, OsO<sub>4</sub>, уранилацетата и заливочных смол.

Абсолютное число клеток БАС составило  $0,80 \pm 0,08 \cdot 10^6$ /мл, что было значительно выше показателей нормы и значений, выявленных в БАС здоровых курильщиков [12]. Была отмечена также тенденция к снижению показателя жизнеспособности клеточных суспензий до  $72,0 \pm 8,2\%$ . Относительное содержание различных клеточных элементов БАС не отличалось от контроля и наблюдений здоровых курильщиков и составило: альвеолярных макрофагов —  $87,5 \pm 3,1\%$ , нейтрофилов —  $8,6 \pm 4,7\%$ , лимфоцитов —  $2,8 \pm 0,8\%$ , эпителиальных цилиндрических клеток —  $10,0 \pm 0,5\%$ . При анализе популяций АМ было обнаружено, что большие формы составили  $17,4 \pm 3,3\%$ , средние —  $67,4 \pm 3,6\%$  и малые —  $14,2 \pm 1,5\%$ , что было расценено как умеренное повышение доли малых форм.

В цитоплазме  $52,8 \pm 8,6\%$  больших и средних форм АМ были выявлены крупные оптически плотные частицы буро-коричневого и черного цвета различной формы (рис.1,а,б,в,г). В некоторых АМ эти частицы были слаболожительными при окраске по Перлсу. Значительное число средних АМ с наличием инородных частиц имели гиперхромную окраску (рис.1,в).

При бактериоскопическом исследовании мазков БАС у 6 ликвидаторов обнаружены грамположительные кокки в виде небольших внеклеточных колоний и единичных форм. У 3 обследованных помимо этого выявлены свободно лежащие колонии грамотрицательных палочек.

При электронно-микроскопическом исследовании у всех обследованных было выявлено, что  $45,0 \pm 1,9\%$  альвеолярных макрофагов содержали в цитоплазме электронно-плотные инородные частицы размером от 0,5 до 1 мкм, занимающие  $51,6 \pm 2,1\%$  цитоплазмы (рис.2,а,б,в,г). В части АМ эти частицы были представлены увеличенными в размерах фагосомами, заполненными гетерогенным по электронной плотности материалом (рис.2,а,б). Другая часть АМ содержала частицы правильной многоугольной формы, часто пентаэдров, с наличием игольчатых светлых структур, являющихся, по всей видимости, структурами кварца или холестерина. Иногда, особенно в пентаэдрах, имелась четкая двухконтурная мембрана, отграничивающая частицы от цитоплазмы альвеолярных макрофагов. Такие частицы содержались, как правило, в больших активированных или разрушающихся клетках. В этих клетках отмечалось небольшое число митохондрий, обычно округлой формы, эндоплазматическая сеть была, как правило, плохо выражена (рис.2,в,г).

При качественном и полуколичественном спектральном микроанализе у 5 мужчин, работавших на промплощадке ЧАЭС, во взвеси зафиксированных клеток обнаружены следующие химические элементы: Na, K, Ca, Mg, Al, Si, P, S, Fe, Cr, Ni, Rb, Sr, In, Tl, Fr, Ce, Pr, Nd, Np, Pu, Pa. В составе инородных частиц в цитоплазме АМ этих же обследованных выявлены такие элементы, как Na, K, P, Zn, Ga, Zr, Sb, In, Nd, Np, Pu, Ir, Pt, Pm, Sm, Se. При рентгеноспектральном микроанализе электронно-микроскопических сеточек, фосфатного буфера, уранилацетата, оксида осмия и эпоксидных смол эти элементы обнаружены не были.

Таким образом, проведенное исследование позволяет описать особенности БАС ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС.

Абсолютное число клеточных элементов в бронхоальвеолярном пространстве превышает значения, характерные для здоровых некурильщиков и курильщиков [12]. Учитывая это, ясно, что в пересчете на 1 мл в БАС ликвидаторов содержится большее число различных популяций альвеолярных

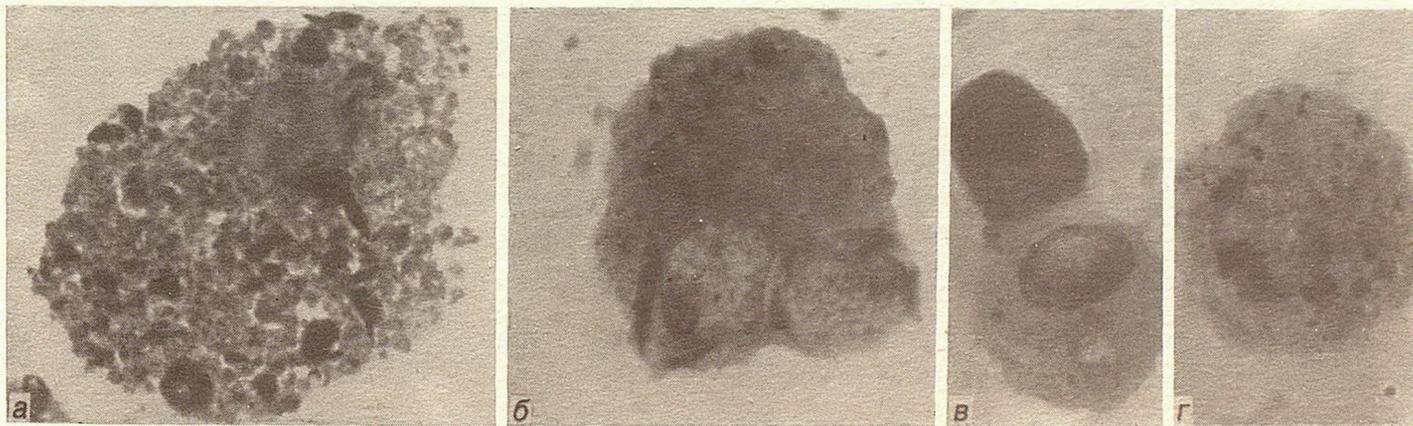


Рис. 1. Мазки бронхоальвеолярных смывов ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. Окраска по Романовскому—Гимзе. Ув.×1200.

а — большой альвеолярный макрофаг с многочисленными крупными оптически плотными частицами в цитоплазме; б — большой альвеолярный макрофаг с единичной крупной округлой и многочисленными мелкими оптически плотными частицами в цитоплазме; в — средний и малый альвеолярные макрофаги (моноцитоподобный альвеолярный макрофаг с резко гиперхромной цитоплазмой); г — Средний альвеолярный макрофаг с единичными крупными частицами округлой и неправильной формы и многочисленными мелкими частицами в цитоплазме.

макрофагов, а также нейтрофилов и лимфоцитов. Эти цитологические изменения, а также обнаружение

колоний грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в бронхоальвеолярном прост-

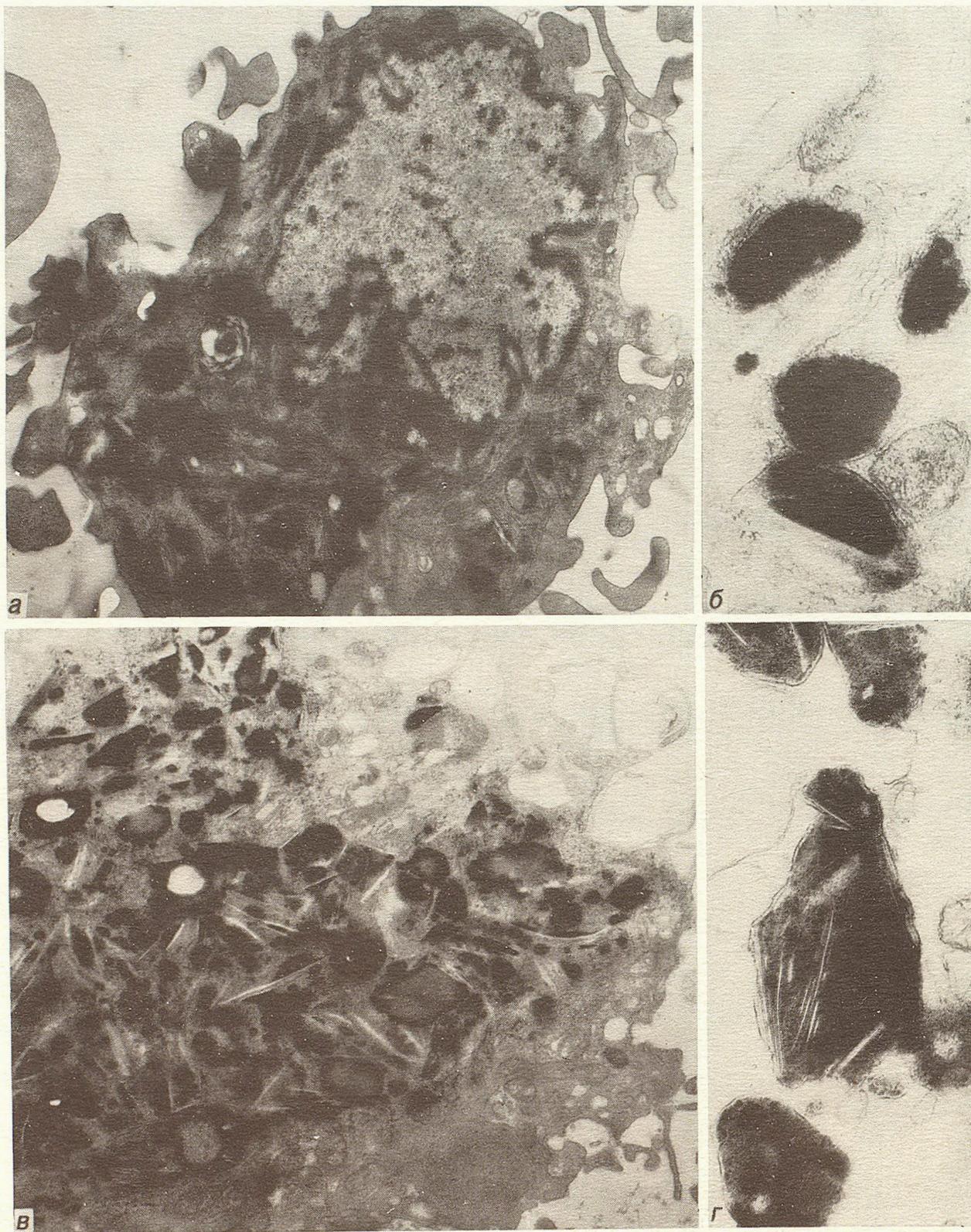


Рис. 2. Электронно-микроскопические фотографии клеток БАС ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС.

*а* — активированный альвеолярный макрофаг с многочисленными цитоплазматическими выростами, развитой эндоплазматической сетью, единичными митохондриями и миелиноподобными структурами в цитоплазме. Многочисленные фагосомы с гетерогенным электронно-плотным материалом. Ув.  $\times 13500$ .  
*б* — фагосомы с аморфным электронно-плотным материалом в цитоплазме альвеолярного макрофага. Ув.  $\times 55000$ . *в* — активированный альвеолярный макрофаг с многочисленными цитоплазматическими выростами, развитой эндоплазматической сетью, единичными митохондриями и миелиноподобными структурами в цитоплазме. Наряду с многочисленными фагосомами с аморфным электронно-плотным материалом в фагосомах определяются кристаллообразные структуры. Ув.  $\times 21000$ . *г* — кристаллообразный материал в фагосоме альвеолярного макрофага. Ув.  $\times 41000$ .

ранстве, мы склонны расценивать как проявление воспалительного процесса в легких умеренной степени активности. Кроме того, увеличение абсолютного числа малых (моноцитоподобных) форм АМ указывает на напряжение макрофагального звена местных защитных реакций в легких, что может быть проявлением действия обнаруженных частиц. В условиях длительного эксперимента установлено, что  $^{239}\text{PuO}_2$  стимулирует развитие хронического воспаления в легких [15].

При световой и электронной трансмиссионной микроскопии было выявлено, что более половины общей популяции АМ ликвидаторов содержат в цитоплазме крупные оптически плотные полигональные частицы. Экспериментальное изучение ультраструктурных характеристик ингалированной смеси  $(\text{U,Pu})\text{O}_2$  установило возможность содержания этих частиц как внутри фагосом с двухконтурной мембраной, так и свободно лежащими в цитоплазме альвеолярных макрофагов [15].

При рентгеноспектральном анализе АМ ликвидаторов аварии на ЧАЭС обнаружены химические вещества, входящие в состав топлива реактора, конструкционных материалов станции и грунтов, составляющих активную и неактивную часть труднорастворимых «горячих частиц», попадающих в легкие при аэрозольном радионуклидном поражении.

Такие элементы, как Zr, Sr, Ce, Pr, Pm, Fr, Sm, Pa, Np, Pu входят в состав ядерного топлива, используемого в реакторах типа Чернобыльского, а также являются активной частью труднорастворимых «горячих частиц» [1,11]. Из состава неактивной части «горячих частиц» были обнаружены Fe, Si, Al и Ca, входящие, как правило, в состав грунтов. Кроме того, в доступной нам литературе имеются единичные исследования, посвященные микроспектральному анализу клеток БАС. Известно, что такие элементы, как Fe, Cu, Zn, Ni, Rb, Ti и Pb являются обычными цитоплазматическими элементами АМ [13]. Полученные данные рентгеноспектрального микроанализа носят предварительный характер и нуждаются в проведении количественного, а возможно, и изотопного анализа тяжелых металлов в составе инородных частиц в цитоплазме АМ. Кроме того, в АМ курильщиков также могут накапливаться тяжелые металлы.

Однако уже сейчас на основании полученных результатов можно предположить, что через 7 лет после аварии на ЧАЭС в альвеолярных макрофагах содержатся элементы разрушающихся труднорастворимых «горячих частиц». Настоящая публикация является первым предварительным сообщением.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Василенко И.Я. Радиобиологические аспекты «горячих частиц»: Обзор // Мед. радиол.— 1991.— N 9.— С.56—58.

2. Воронина Л.М., Грובהва О.М., Бронская Л.К. Бронхоэктатическая болезнь: цитобактериоскопическая характеристика бронхоальвеолярных смывов // Клин. лаб. диагност.— 1992.— N 7—8.— С.71—74.
3. Иванов А.И., Куршакова Н.Н., Соловьев А.И. Радиационный рак легкого.— М.: Медицина, 1990.
4. Израэль Ю.А., Петров В.Н., Авдюшин С.И. и др. Радиоактивное загрязнение природных сред в зоне аварии на Чернобыльской АЭС // Метеорол. и гидрол.— 1987.— N 2.— С.5—18.
5. Кутьков В.А., Иванов В.А. Микрораспределение альфаизлучающих нуклидов и радиобиологический эффект // Радиобиологический эксперимент и человек.— М., 1986.— С.79.
6. Радиогеохимия в зоне влияния Чернобыльской АЭС.— Киев: Наукова думка, 1992.
7. Сухоручкин А.К. Определение смеси радионуклидов Чернобыльского выброса в легких человека // Радиобиология.— 1992.— Т.32, N 2.— С.163—171.
8. Aita S., Hoshino T., Iwata H. Identification of submicroscopic asbestos fibrils in tissue by analytical electron microscopy // JEOL News.— 1974.— Vol.12, N 2.— P.2—4.
9. Biological Effects of Inhaled Radionuclides. Annals of the ICRP. Publ. 31.— Oxford: Pergamon Press, 1979.
10. Galvin J.B., Bice D.E., Guilmette R.A. et al. Pulmonary immune response of dogs after exposure to  $[^{239}\text{PuO}_2]$  // Int. J. Radiol. Biol.— 1989.— Vol.55, N 2.— P.285—296.
11. Kutkov V.A., Muravjev Y.B., Arefeva Z.S. et al. Internal doses of chernobyl accident witnesses including doses from nuclear fuel particles // Umweltradioaktivitat, Radioökologie, Strahlenwirkungen.— Köln: Verlag TUV Rheinland, 1993.— S.816—820.
12. Lin C.-C., Huang W.-C., Lin C.-Y. Chemiluminescence and antibodydependent, cell-mediated cytotoxicity between human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in smokers, nonsmokers, and lung cancer patients // Chest.— 1989.— Vol.95, N 3.— P.553—557.
13. Maier E.A., Dietemann-Molart A., Rastegar F. et al. Simultaneous determination of trace elements in lavage fluids from human bronchial alveoli by energy-dispersive X-ray fluorescence. 3. Routine analysis // Clin. Chem.— 1987.— Vol.33, N 12.— P.2234—2239.
13. Muller H.L., Drosselmeyer E., Hotz G. et al. Behaviour of spherical and irregular  $(\text{U,Pu})\text{O}_2$  particles after inhalation or intratracheal instillation in rat lung and during in vitro culture with bovine alveolar macrophages // Int. J. Radiat. Biol.— 1989.— Vol.55, N 5.— P.829—842.
14. Muller H.L., Drosselmeyer E., Hotz G. et al. Cellular aspects of retention and transport of inhaled soluble and insoluble actinide compounds in the rat lung // Sci. Total Environment.— 1989.— Vol.83.— P.239—251.
15. Reynolds H.Y. Broncho-alveolar lavage // Am. Rev. Respir. Dis.— 1987.— Vol.135.— P.250—253.
16. Sanders C.L., Lauhala K.E., McDonald K.E. Quantitative scanning electron microscopic autoradiography of inhaled  $^{239}\text{PuO}_2$  // Health. Phys.— 1989.— Vol.56, N 3.— P.321—325.
17. The Radiobiological Impact of Hot Beta-Particles from the Chernobyl Fallout: Risk Assessment (Working material of research coordination meeting within the IAEA — Co-ordinated research program).— Vienna, 1992.
18. Voisin C., Wallaert B. Empoussierage professionnel et bronchopneumopathie chronique obstructive (de l'approche etiopathogenique au probleme de reparation en milieu minier) // Bull. Acad. Nat. Med.— 1992.— Vol.176, N 2.— P.243—252.