

© С. В. Мелехин, В. А. Четвертных, М. В. Чунарева, 2014
УДК 611.428:611.383:612.482:599.323.4

С. В. Мелехин, В. А. Четвертных и М. В. Чунарева

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ У МЫШЕЙ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ РОДИТЕЛЕЙ

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. В. А. Четвертных), Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е. А. Вагнера

На 93 белых беспородных мышях первого поколения, полученных от родителей, облученных в дозе 0,3 и 3,0 Гр, изучены изменения структуры и клеточного состава брыжеечных лимфатических узлов после однократной внутрибрюшинной иммунизации эритроцитами барана. При этом более выраженные изменения (гипоплазия лимфоидной ткани с уменьшением числа лимфоцитов и плазматических клеток, рост количества клеток в состоянии апоптоза, макрофагов, ретикулярных клеток и объема клеточного детрита) обнаружены после воздействия высокой дозы ионизирующей радиации. Наблюдались разрастание стромы узла, расстройства кровообращения и отек ткани. Процессы редукции лимфоидной ткани в корковом веществе отражались и на структуре мозгового вещества, что в конечном итоге приводило к ранней инволюции узла, отражая сдвиги в общих адаптационных и защитных реакциях всей иммунной системы.

Ключевые слова: брыжеечные лимфатические узлы, ионизирующее излучение, облученные родители, потомство первого поколения, иммунизация

Согласно современным представлениям, брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) являются важной частью иммунной системы. Им принадлежит значительная роль в лимфоцитопоезе, формировании иммунного ответа и рециркуляции лимфоцитов [1, 6]. Поэтому изучение их структуры и иммунореактивности по отношению к различным воздействиям, включая прямое влияние ионизирующего излучения на человека и животных, довольно активно проводится уже несколько десятилетий [8]. В то же время, исследования морфофункциональных особенностей вторичных лимфоидных органов у потомства облученных родителей, подвергнутого в дальнейшем экстремальным воздействиям, весьма немногочисленны [7].

Целью настоящей работы являлось изучение структуры и динамики изменений клеточного состава БЛУ после иммунизации (ИМЦ) мышей, родившихся от пар, подвергнутых ионизирующему излучению.

Материал и методы. Эксперимент проведен на 93 белых беспородных мышях первого поколения, родители которых (88 животных массой $19 \pm 1,6$ г) в 3-месячном возрасте были подвергнуты одновременному однократному тотальному гамма-облучению. Использовали 2 дозы облучения: 0,3 Гр (промежуточная) и 3,0 Гр (сублетальная). Через

20 сут после стихания острого лучевого синдрома проводили спаривание родителей. В контрольной группе спаривали необлученных животных. В вариантах с облучением самцов в дозе 3,0 Гр потомство не было получено, несмотря на неоднократное повторение опыта в летний период.

Все животные, родившиеся от интактных и от облученных родителей из двух вариантов опыта, были разделены на 4 группы: 1-я — интактные взрослые мыши ($n=15$); 2-я — мыши, родившиеся от необлученных родителей (контрольная группа — $n=38$); 3-я — мыши, родившиеся от облученных в дозе 0,3 Гр родителей ($n=48$); 4-я — мыши, родившиеся от облученных в дозе 3,0 Гр самок и необлученных самцов ($n=45$). Все исследования проводили согласно правилам Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (г. Страсбург, 1986).

Мыши 2-, 3-й и 4-й групп в 2-месячном возрасте были иммунизированы однократно внутрибрюшинно эритроцитами барана — 1×10^8 в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Через 5, 7, 14, 30 сут после ИМЦ БЛУ фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин. Серийные срезы для изучения общей структуры окрашивали гематоксилином — эозином, азуром II — эозином. Окраску по методу Ван-Гизона и Маллори, а также импрегнацию AgNO_3 по Гомори использовали для выявления стромы. Для оценки содержания РНК в клетках срезы окрашивали метиловым зеленым — пиронином по Браше с использованием в контроле РНКазы. Подсчитывали количество различных клеточных форм в структурно-функциональных зонах изученных органов в расчете на 1000 клеток, используя микроскоп МС-20

Сведения об авторах:

Мелехин Сергей Витальевич (e-mail: ser-mel30@yandex.ru), Четвертных Виктор Алексеевич (e-mail: rector@psma.ru), Чунарева Марина Валерьевна (e-mail: chunaryova@bk.ru), кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е. А. Вагнера, 614990, Пермский край, г. Пермь, ул. Куйбышева, д. 39

(Micros, Австрия). Размеры БЛУ и лимфоидных узелков (ЛУ) и их структурных компонентов определяли с помощью морфометрической установки Олимпус (Олимпус, Япония) и компьютерного программного обеспечения IMAGPRO+ (free version).

Среднее арифметическое значение, его стандартную ошибку ($s_{\bar{x}}$), стандартное отклонение (δ) определяли применяя программное обеспечение Microsoft Excel 2003 SP1, StatSoft 6.0. При использовании *t*-критерия Стьюдента различия между группами считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. Органы интактных мышей (1-я группа) имели типичное гистологическое строение и обычный клеточный состав. На срезе толщина мозгового вещества преобладала над таковой коркового вещества, составляя, соответственно, 951 ± 15 мкм и 650 ± 16 мкм. Высота ЛУ достигала 241 ± 5 мкм, ширина — 277 ± 6 мкм.

В ЛУ преобладали лимфоциты ($647 \pm 14\%$), стромальные клетки ($213 \pm 10\%$) и пиронинофильные лимфоциты — ПФЛ ($45 \pm 3\%$). Бластные формы, плазмциты, макрофаги и клетки, делящиеся митозом, составляли $12,0 \pm 1,3$, $5,6 \pm 0,8$, 30 ± 3 и $2,0 \pm 0,3\%$ соответственно. Доля клеточных форм с измененной структурой составляла $29 \pm 4\%$, лимфоцитов в состоянии апоптоза — $15,7 \pm 1,5\%$. В мозговых тяжах доля плазмцитов составляла $9,6 \pm 0,8\%$. Мозговые лимфатические

синусы (МЛС) содержали в основном лимфоциты, макрофаги и ретикулярные клетки.

После ИМЦ в БЛУ у мышей, полученных от необлученных родителей (2-я группа), с 5-х суток выявлялась гиперплазия лимфоидной ткани (ЛТ). Толщина коркового вещества на 7-е сутки увеличилось до 1060 ± 17 мкм, в нем определялись крупные вторичные ЛУ (рис. 1, а). В центрах размножения (ЦР) ЛУ наблюдалась активная бласттрансформация лимфоцитов (БТЛ). Число бластных форм увеличивалось в 6,9 раза. Бластные формы определялись и в расширенной паракортикальной области (см. рис. 1, б). На 7-е сутки ЛУ имели максимальную высоту ($381,0 \pm 7,1$ мкм) и ширину ($432,2 \pm 7,1$ мкм). В их ЦР значимо увеличивалось число клеток, делящихся митозом ($13,5 \pm 0,3\%$), ПФЛ ($108 \pm 11\%$), плазмцитов ($15,8 \pm 2,3\%$), а также клеточных форм с измененной структурой ($59 \pm 3\%$) и лимфоцитов в состоянии апоптоза ($32,0 \pm 2,0\%$). Значительно возрастали объем клеточного детрита (особенно в ЦР) и число макрофагов ($41,5 \pm 2,0\%$). Мозговые тяжи утолщались, а число плазмцитов в них увеличивалось в 5,7 раза. МЛС становились шире и содержали очень большое количество лимфоцитов, макрофагов и ретикулярных клеток. Отмечалось расширение и полнокровие сосудов с умеренным отеком ЛТ.

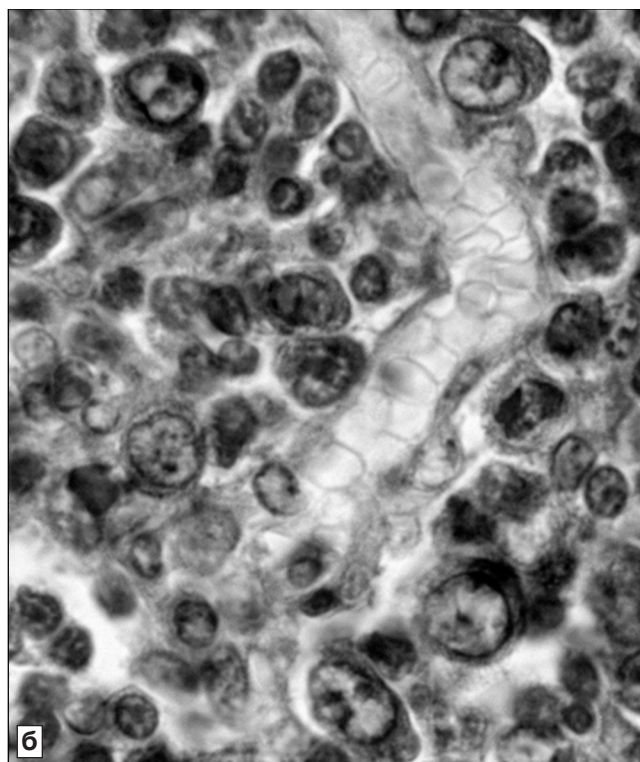
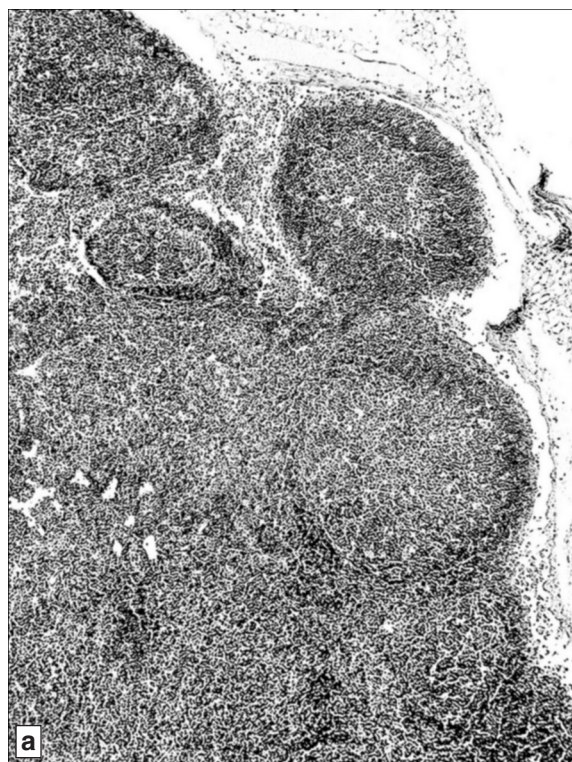


Рис. 1. Брыжеечные лимфоидные узлы мыши от необлученных родителей (2-я группа) на 7-е сутки после иммунизации.

а — крупные вторичные лимфоидные узелки в корковом веществе; б — многочисленные бластные формы в паракортикальной области и стаз эритроцитов в сосуде. Окраска: а — по Ван-Гизону; б — по методу Браше. а — об. 10, ок. 10; б — об. 100, ок. 10

Строма реагировала незначительным утолщением ретикулярных и коллагеновых волокон.

К 14-м суткам объем ЛТ уменьшался и к окончанию опыта вместе с числом клеточных элементов практически соответствовал показателям у интактных мышей. Только МЛС оставались широкими и содержали немного больше ретикулярных клеток и макрофагов, чем у мышей 1-й группы. Волокнистый каркас стромы почти не изменялся по сравнению с исходным состоянием, сохранялось незначительное полнокровие сосудов.

У животных, полученных от родителей, облученных в дозе 0,3 Гр (3-я группа), изменения структуры БЛУ напоминали таковые в предыдущей группе, но были менее выражены. Толщина коркового вещества возрастала до 976 ± 9 мкм. Умеренное увеличение числа и размеров ЛУ, количества ПФЛ и делящихся клеток начиналось с 7-х суток. Вторичных ЛУ было меньше, а самые крупные из них выявлялись на 14-е сутки (рис. 2, а), но размеров узелков в контрольной группе они не достигали. Высота узелков равнялась 350 ± 7 мкм, а ширина — 402 ± 7 мкм. В этих ЛУ наблюдалась менее выраженная БТЛ. Число бластных форм увеличивалось в 4,8 раза. Только

на 14-е сутки определялся максимальный плазмацитогенез, но количество плазмацитов было меньше, чем во 2-й группе ($12,4 \pm 1,1\%$). Некоторые БЛУ имели более узкую, с небольшой отеком паракортикальную область. В большей степени, чем во 2-й группе, увеличивались содержание клеток с измененной структурой ($73 \pm 5\%$), объем клеточного детрита (особенно в ЦР) и число макрофагов ($52 \pm 3\%$). В МЛС выявлялось повышенное количество стромальных клеток и фагоцитов, а в мозговых тяжах в 3,4 раза возрастало число клеток плазматического ряда (см. рис. 2, б). Во все сроки содержание ретикулярных клеток превышало контрольные показатели. Определялись более выраженные сосудистые расстройства. Коллагеновые и ретикулярные волокна стромы умеренно утолщались, иногда формируя небольшие пучки вокруг сосудов (рис. 3). К 30-м суткам происходило только частичное восстановление структуры БЛУ: уменьшение сосудистых нарушений и отека ЛТ.

Самые существенные изменения в БЛУ были выявлены у мышей, полученных от самок, облученных в дозе 3,0 Гр и необлученных самцов (4-я группа). Увеличение объема ЛТ в БЛУ было

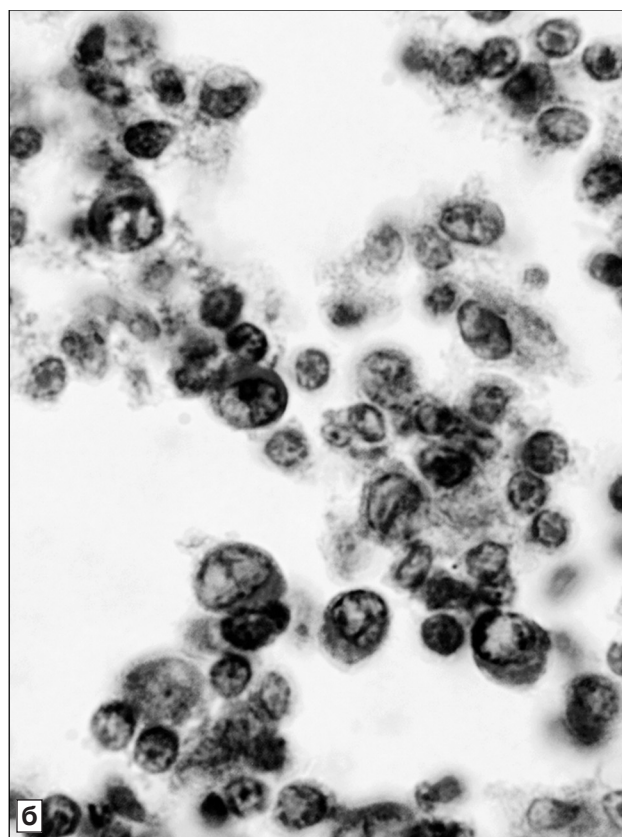
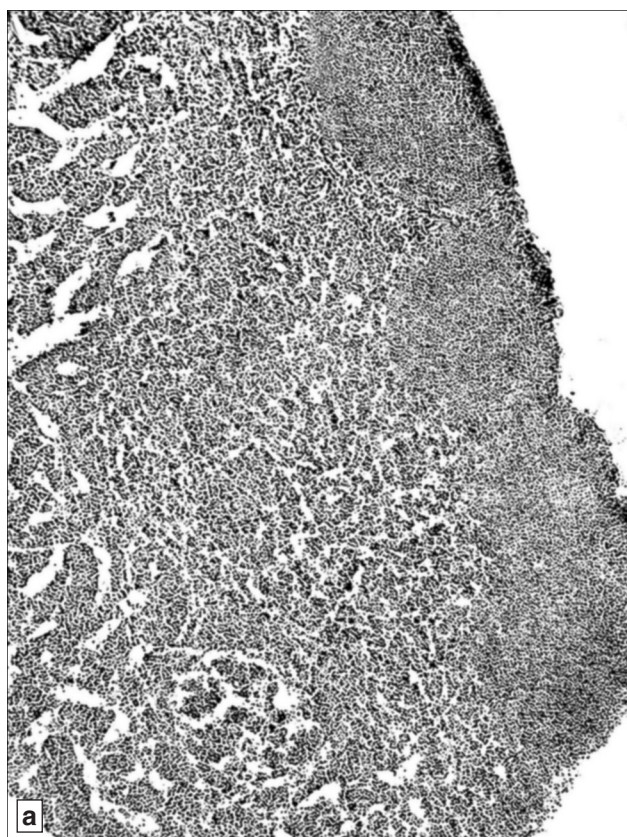


Рис. 2. Брыжеечные лимфатические узлы мыши от родителей, облученных в дозе 0,3 Гр (3-я группа) на 14-е сутки после иммунизации.

а — первичные лимфоидные узелки в корковом веществе; б — плазмацитогенез в мозговых тяжах. Окраска: а — гематоксилином — эозином; б — по методу Браше. а — об. 10, ок. 10; б — об. 100, ок. 10

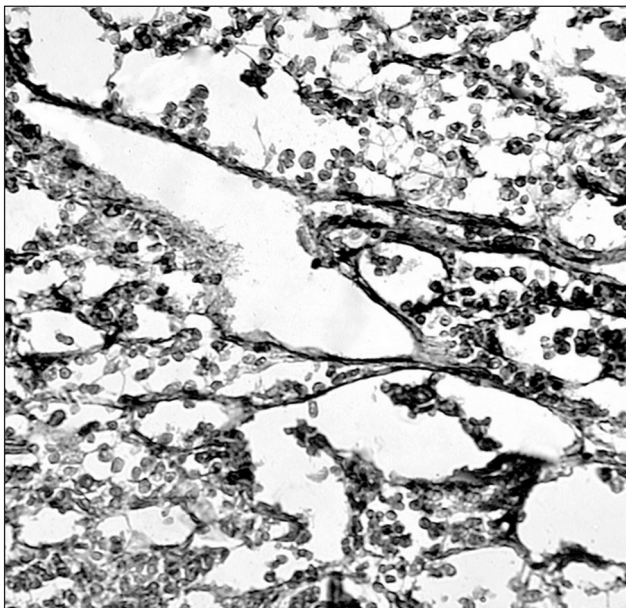


Рис. 3. Брыжеечный лимфатический узел мыши от родителей, облученных в дозе 0,3 Гр (3-я группа), на 30-е сутки после иммунизации. Умеренное утолщение волокон стромы в мозговом веществе.

Окраска по методу Маллори. Об.40, ок.10

самым минимальным. Толщина коркового вещества возрастала только до 870 ± 8 мкм. Количество ЛУ и их размеры были меньше, чем во 2-й и 3-й группах. Большинство ЛУ не имели ЦР, а максимальных размеров они снова достигали на 14-е сутки. Высота их составляла 318 ± 7 мкм, а ширина — 371 ± 6 мкм. Иногда встречался диффузный тип строения коркового вещества (рис. 4, а). Во все сроки в ЛУ содержание лимфоцитов возрастало в меньшей степени с одновременным ростом количества клеток стромы. Незначительно увеличивалось число ПФЛ ($56,4 \pm 2,9\%$), делящихся клеток ($6,7 \pm 0,5\%$), но именно в этой группе содержание клеточных форм с измененной структурой ($96 \pm 5\%$) и клеток в состоянии апоптоза ($71 \pm 3\%$) было наибольшим. В 1-ю неделю максимально возрастал объем клеточного детрита, который располагался как свободно, так и, наряду с апоптозными клеточными формами, в цитоплазме многочисленных макрофагов и ретикулярных клеток (см. рис. 4, б). Наименьшую плотность расположения клеток имели межузелковые части. Паракортикальные области были отечны, а в некоторых БЛУ они практически редуцировались. Широкие МЛС, вплоть до 30-х суток, содержали умеренное количество лимфоцитов, ретикулярных клеток и макрофагов. В мозговых тяжах рост числа плазмочитов был самым низким (в 2,6 раза). Ретикулярные волокна утолщались и формировали грубые пучки (см. рис. 4, в). В некоторых БЛУ

к 30-м суткам в корковом веществе определялось очаговое разрастание соединительной ткани (см. рис. 4, г). Восстановление структуры протекало очень медленно. Гипоплазия ЛТ, наличие самых значительных нарушений кровообращения и признаков отечности сохранялись в БЛУ до окончания эксперимента.

Обсуждение полученных данных. В данном исследовании в БЛУ самые существенные нарушения были выявлены у животных, родившихся от самок, облученных в дозе 3,0 Гр, и необлученных самцов. Определялась гипоплазия ЛТ с уменьшением числа лимфоцитов и плазматических клеток, увеличением количества клеток в состоянии апоптоза, макрофагов, ретикулярных клеток, а также объема клеточного детрита. Наблюдалось значительное разрастание стромы, расстройства кровообращения с отеком ткани.

В настоящее время наследование последствий потомками первого поколения после воздействия ионизирующим излучением половых клеток родителей доказано только в отношении канцерогенных эффектов, нарушений эмбрионального развития, гибели зародышей, а также некоторых изменений постнатального онтогенеза [2, 5]. Эти эффекты обычно зависят от дозы облучения и их возникновение связывают с мутациями того или иного типа. Однако получены данные, что определенные изменения не зависят от дозы, а объясняются особым феноменом — радиационно-индуцированной нестабильностью генома (РИНГ) у родителей с возможной ее передачей в соматические клетки потомства [4]. По этому вопросу имеются противоречивые взгляды на роль как больших, так и малых доз ионизирующего излучения [3, 9].

Ранее были проведены исследования селезенки у мышей первого поколения от родителей, получивших различные дозы ионизирующего излучения [7]. Наиболее заметные нарушения после антигенного воздействия определены у мышей, родившихся от пар, облученных в дозе 0,3 Гр. Изменения в органе при использовании промежуточной по величине дозы 0,3 Гр, вероятно, объясняются феноменом РИНГ у родителей с возможной ее трансмиссией в лимфоциты и другие клетки селезенки у потомства.

Изменения в БЛУ в наших исследованиях были дозозависимы и нарастали с увеличением дозы ионизирующего излучения. Процессы редукции ЛТ в корковом веществе отражались и на структуре мозгового вещества, что в конечном итоге приводило к ранней инволюции БЛУ, свиде-

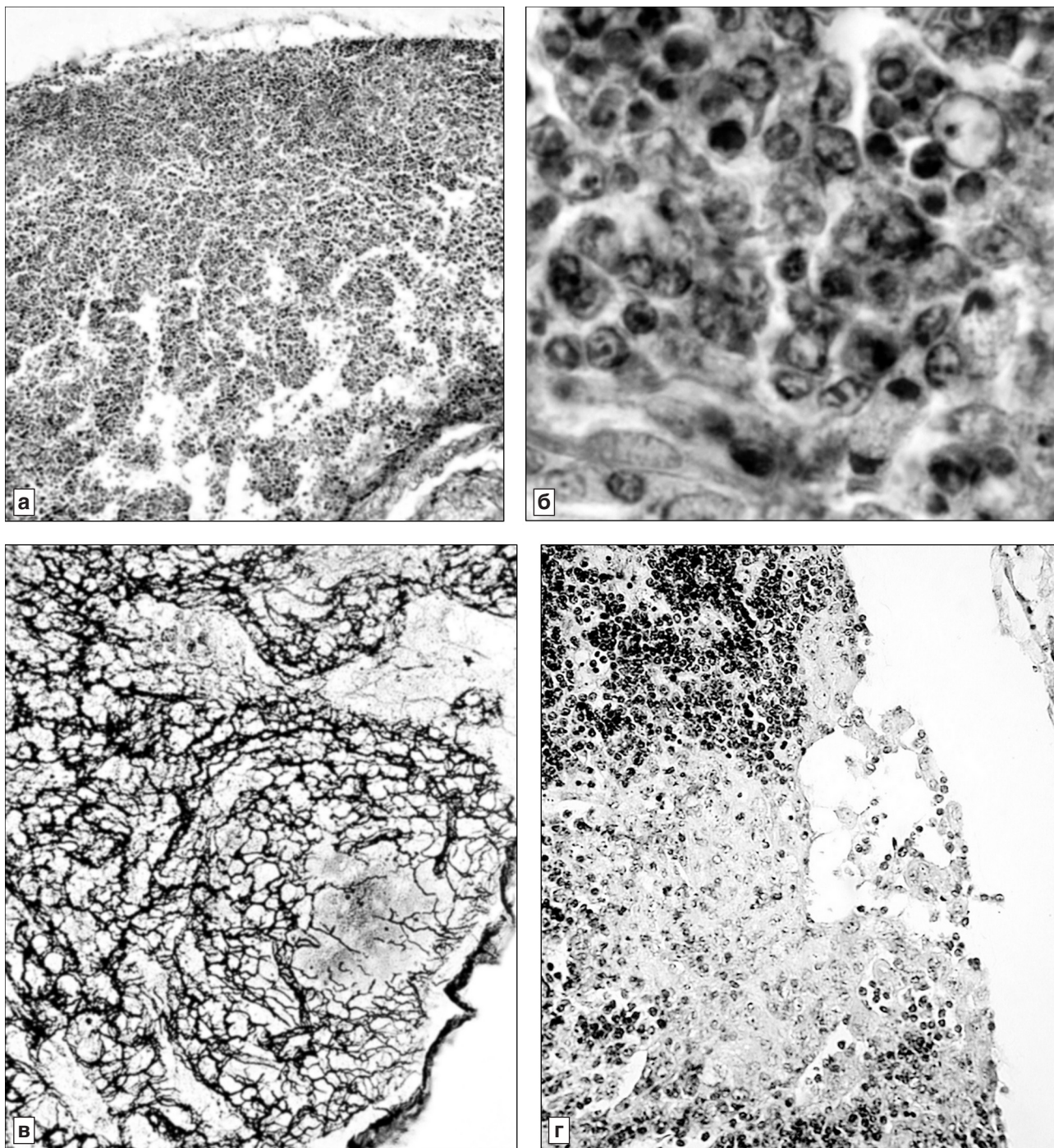


Рис. 4. Брыжеечные лимфатические узлы мыши от облученных самок в дозе 3,0 Гр и необлученных самцов (4-я группа) на 14-е (а, б) и 30-е (в, г) сутки после иммунизации.

а — диффузный тип строения коркового вещества и отечность паракортикальной области; б — фагоцитоз макрофагом (внизу рисунка) и ретикулярной клеткой (вверху рисунка) детрита и апоптотных лимфоцитов; в — утолщение ретикулярных волокон и формирование пучков; г — разрастание соединительной ткани в корковом веществе и резкое уменьшение в нем количества лимфоцитов. Окраска: а — гематоксилином—эозином; б — по методу Браше; в — импрегнация нитратом серебра по методу Гомори; г — окраска по Ван-Гизону. а — об.20, ок.10; б — об.100, ок.10; в, г — об.40, ок.10

тельствующей о сдвигах в общих адаптационных и защитных реакциях всей иммунной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белянин В. Л. и Цыпलाков Д. Э. Диагностика реактивных гиперплазий лимфатических узлов. СПб.-Казань, Чувашия, 1999.
2. Воробцова И. Е. Соматические и генетические последствия действия радиации (сравнительный аспект). Радиобиология, 1991, т. 31, вып. 4, с. 568–577.
3. Котеров А. Н. Радиационно-индуцированная нестабильность генома при действии малых доз радиации в научных публикациях и в документах международных организаций. Мед. радиол. и радиацион. безопасность, 2009, т. 54, № 4, с. 5–13.

4. Мазурик В. К. и Михайлов В. Ф. Радиационно-индуцированная нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение. Радиационная биология. Радиоэкология, 2001, т. 41, № 3, с. 272–289.
5. Нефедов И. Ю. и Палыга Г. Ф. Лучевые эффекты в онтогенезе потомства одного или обоих облучённых родителей. Радиационная биология. Радиоэкология, 1995, т. 35, № 3, с. 370–374.
6. Сапин М. Р. и Этинген Л. Е. Иммунная система человека. М., Медицина, 1996.
7. Чунарева М. В. Морфофункциональные изменения паренхимы селезенки и клеточного состава крови у мышей первого поколения, родившегося от облучённых родителей. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2012.
8. Ярилин А. А., Полушкина Э. Ф. и Анохин Ю. Н. Различия механизмов радиационного подавления иммунного ответа в селезёнке и лимфатических узлах. Иммунология, 1981, № 2, с. 25–30.
9. Ярмоненко С. П. Проблемы радиобиологии человека в конце XX столетия. Мед. радиол. и радиационная безопасность, 2012, т. 51, № 2, с. 8–14.

Поступила в редакцию 23.05.2014
Получена после доработки 03.06.2014

STRUCTURAL CHANGES AND CELLULAR COMPOSITION OF THE MESENTERIAL LYMPH NODES IN MICE OF FIRST GENERATION AFTER PARENTAL EXPOSURE TO RADIATION

S.V.Melekhin, V.A.Chetvertnykh and M.V.Chunaryova

Changes of the structure and cellular composition of mesenteric lymph nodes were studied in 93 outbred albino mice born from parents exposed to 0.3 and 3.0 Gy of the ionizing radiation, after single intraperitoneal immunization of the offspring with sheep erythrocytes. The changes (lymphoid tissue hypoplasia with the reduction of lymphocyte and plasma cell numbers, increase of apoptotic cell, macrophage and reticular cell numbers, as well as cell detritus volume) were more pronounced after an exposure to high-dose radiation. The outgrowth of node stroma, circulatory disturbances and tissue edema were observed. The processes of lymphoid tissue reduction in the cortex affected the medullary structure, finally resulting in the early lymph node involution, that reflected the changes in the general adaptation and defense reactions of the whole immune system.

Key words: *mesenteric lymph nodes, ionizing radiation, irradiated parents, first generation offspring, immunization*

Department of Histology, Embryology and Cytology,
Ye.A.Wagner Perm' State Medical Academy