

© Д.Е. Григоренко, М.Р. Сапин, Л.М. Ерофеева, 2015  
УДК 611.41:599.323.4

Д.Е. Григоренко, М.Р. Сапин, Л.М. Ерофеева

## ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ЛИМФОИДНЫХ СТРУКТУР СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ В НАЗЕМНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ И ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Лаборатория функциональной анатомии (зав. — чл.-кор. РАН проф. М.Р. Сапин), Научно-исследовательский институт морфологии человека РАН, Москва

Морфометрическими методами в селезенке изучен клеточный состав центров размножения лимфоидных узелков и периаартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) у самцов мышей C57/bl6 в возрасте 19–20 нед после 30-суточного космического полета, моделировании факторов космического полета в наземном эксперименте и в группе виварного контроля. После наземного эксперимента, по сравнению с виварным контролем, в ПАЛМ снижается функциональная активность морфологической зоны созревания Т-лимфоцитов. В центрах размножения лимфоидных узелков после наземного эксперимента сохраняются лимфоцитопозы и бласттрансформация клеток, характеризующие морфофункциональную активность этой зоны и гуморальный иммунитет. После космического полета, по сравнению с наземным экспериментом, в ПАЛМ изменения клеточного состава менее выражены, чем в центрах размножения лимфоидных узелков. Установлено, что ПАЛМ являются более устойчивой морфологической зоной, тогда как центры размножения лимфоидных узелков в селезенке являются своеобразной «зоной-мишенью», наиболее остро реагирующей на различные факторы космического полета.

**Ключевые слова:** селезенка, клеточный состав, лимфоидные структуры, космический полет, мыши

В условиях космического полета одним из важнейших факторов, воздействующих на организм человека, является невесомость. На космическом биоспутнике «БИОН-М1» проведен эксперимент по изучению влияния невесомости на клеточные и молекулярные механизмы адаптации организма млекопитающих к условиям длительного космического полета [1]. При изучении невесомости на экспериментальных моделях установлено отчетливое изменение гомеостаза и биоэнергетики в тканях организма животных [6, 7, 9]. Вместе с тем, известно, что именно от состояния иммунной системы зависит стабильное функционирование организма при воздействии различных внешних факторов и возможность сопротивляемости организма в экстремальных ситуациях [7, 8, 10]. В ранее проведенных наземных экспериментах по изучению гипокинезии (на обезьянах и крысах) и после космических полетов (у песчанок) установлено, что у всех животных происходят значительные изменения в органах иммуногенеза (в селезенке, лимфатических узлах), а также в лимфоидных структурах органов пищеварительной системы (в частности, в тонкой кишке) [2–5]. Исходя из этого, целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение реакции лимфоидной ткани селезенки у мышей при моделировании космического полета (в наземном эксперименте) и

непосредственно после длительного 30-суточного космического полета.

**Материал и методы.** В качестве объекта исследований были выбраны мыши-самцы линии C57/bl6 в возрасте 19–20 нед. Изучены 3 группы животных. 1-я группа — полетный эксперимент — мыши (5 особей) находились на борту биоспутника «БИОН-М1» в условиях невесомости в течение 30 сут, где животных содержали в блоках «БИОС-МЛЖ» [1]. 2-я группа — наземный эксперимент (8 мышей), в котором воспроизводились аналогичные условия среды обитания на биоспутнике в течение 30 сут. В наземном эксперименте блоки содержания животных («БИОС-МЛЖ») были установлены в климатической камере, в которой температура, влажность и газовый состав атмосферы соответствовали условиям в полете биоспутника [1]. Освещенность в блоках осуществлялась при 12-часовом световом дне. 3-ю группу животных содержали в стандартных условиях вивария (6 особей), в котором условия микроклимата практически не отличались от показателей на биоспутнике и в наземном эксперименте [1]. Животные виварной группы получали стандартный гранулированный комбикорм и воду в свободном доступе. Полетные животные и мыши в наземном эксперименте получали пастообразный корм, изготовленный из стандартного комбикорма, воды и казеина (в качестве загустителя). Содержание воды в пастообразном корме составляло 76–78% [1]. Животные были выведены из эксперимента методом цервикальной дислокации после его окончания. Эксперименты выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, 18 марта 1986 г.), и приказом № 742 Министерства высшего

### Сведения об авторах:

Григоренко Дина Ефремовна (e-mail: [dinagrigorenko@yahoo.com](mailto:dinagrigorenko@yahoo.com)), Сапин Михаил Романович, Ерофеева Людмила Михайловна, лаборатория функциональной анатомии, Научно-исследовательский институт морфологии человека РАН, 117418, Москва, ул. Цюрупы, 3

и среднего специального образования СССР «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 13.11.1984 г.

Селезенку мышей фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали азуром II—эозином и гематоксилином — эозином. Подсчет всех клеток в лимфоидных зонах селезенки проводили при увеличении 100 (масляная иммерсия). Использовали окулярную 25-узловую морфометрическую сетку с шагом 10 мкм. Изучали качественный и количественный клеточный состав лимфоидных структур селезенки — узелков и периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ). Анализ абсолютного и относительного (в %) числа клеток в структурных зонах органа проводили на единице площади гистологического среза (880 мкм<sup>2</sup>). Статистическая обработка результатов проведена по программе Statistika 6.0 и Excel. Значимыми считали различия при  $P \leq 0,05$ .

**Результаты исследования.** В селезенке мышей виварного контроля лимфоидные структуры представлены в основном лимфоидными узелками без центра размножения. Немногочисленные лимфоидные узелки содержали центры размножения, которые были небольшими, слабо выраженными и расположены асимметрично (сдвинуты к периферии узелка).

Плотность распределения клеток в центрах размножения лимфоидных узелков составляет 45 клеток на единице площади гистологического среза, где основную долю всех клеток составляют средние лимфоциты (25%) (рисунк, а).

Малодифференцированные клетки представлены бластами и большими лимфоцитами, на долю которых приходится 13% (2,8% — бласты, 10% — большие лимфоциты). Выявлены клетки с фигурами митоза (0,9%) (см. рисунок, в), зрелые (антителопродуцирующие) плазматические клетки (2,0%) и незрелые плазматические клетки (плазмобласты — 0,97%). Малых лимфоцитов в 1,8 раза меньше, чем средних (см. рисунок, а). В центрах размножения лимфоидных узелков в равном количестве выявлены ретикулярные и деструктивно измененные клетки (20 и 18,7% — различия незначимы, см. рисунок, б). Содержание макрофагов в 3,7 раза меньше, чем деструктивно измененных клеток (5%).

На гистологических срезах селезенки у мышей виварного контроля ПАЛМ широкие, четко дифференцируются. Плотность распределения клеток в них составляет 56,73 клетки на стандартной площади среза, основную долю среди которых (61%) составляют лимфоциты — малые и средние лимфоциты (46 и 14,6% соответственно). В ПАЛМ среди клеток лимфоидного ряда выявлены бласты (0,1%) и большие лимфоциты (2,7%). Плазматические клетки (см. рисунок, г) представлены незрелыми плазмобластами (0,6%) и зрелыми (антителопродуцирующими) плазмочитами

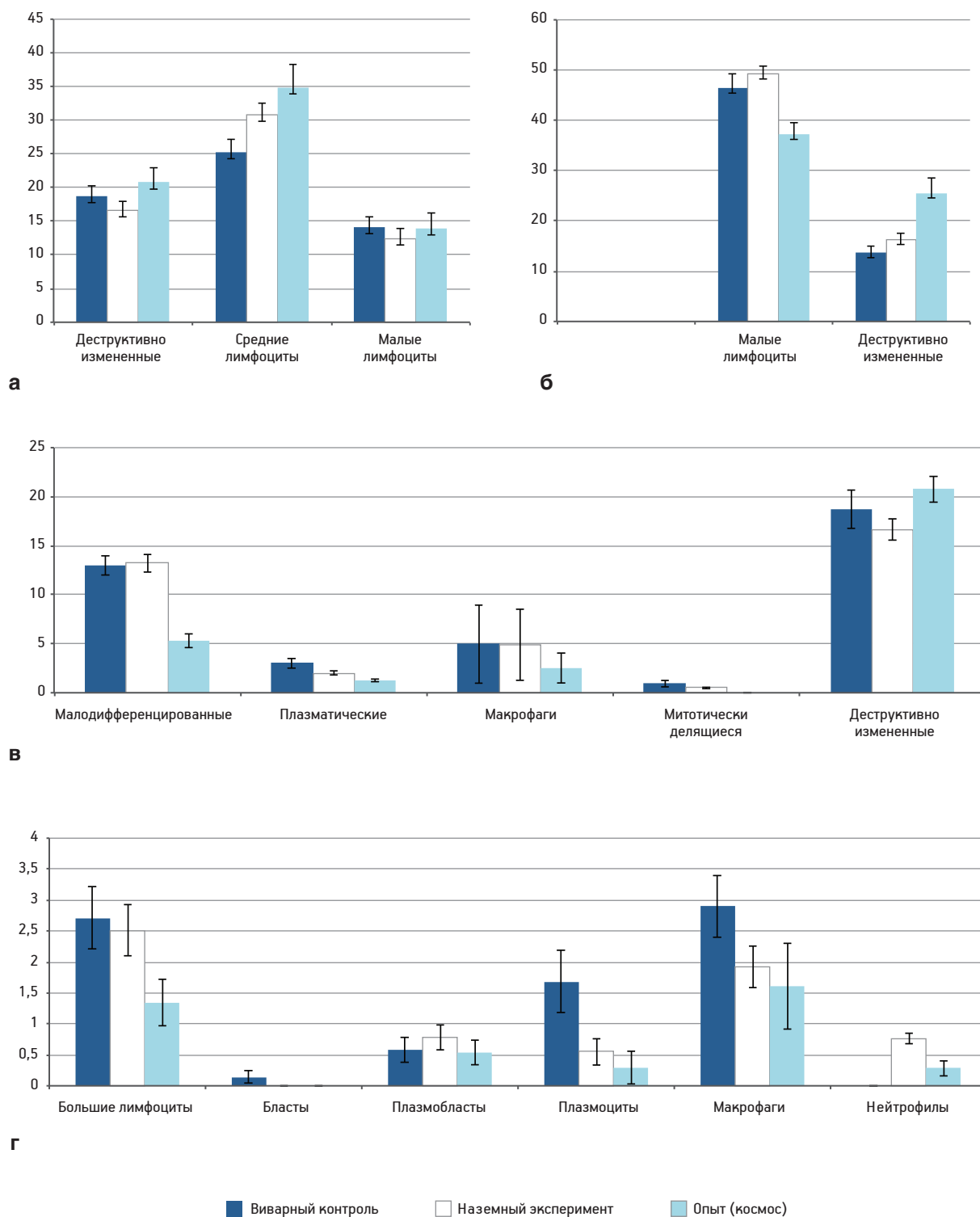
(1,7%). Выявлены клетки в состоянии деструкции (13,7%, см. рисунок, в) и макрофаги (2,9%). Клетки с фигурами митоза отсутствуют.

После 30-суточного наземного эксперимента, по сравнению с виварным контролем, отмечается резкое уплотнение клеточной популяции в центрах размножения лимфоидных узелков: плотность клеток увеличивается на 27,6 клеток (до 72,7 клеток). После наземного эксперимента выявлено снижение только числа клеток с фигурами митоза в 1,8 раза (до 0,5%) и значимое уменьшение доли зрелых антителопродуцирующих плазматических клеток — в 2,3 раза (до 0,9%, см. рисунок, в). После наземного эксперимента в центрах размножения лимфоидных узелков селезенки количество малодифференцированных клеток, деструктивно измененных клеток, макрофагов и ретикулярных клеток значимо не изменяется (см. рисунок, в).

В ПАЛМ селезенки мышей после 30-суточного наземного эксперимента изменения клеточного состава более выражены, чем в центрах размножения лимфоидных узелков, где, по сравнению с виварным контролем, плотность распределения клеток на единице площади среза увеличивается на 32,5 клетки (до 89,3 клетки). В ПАЛМ исчезают бласты, количество плазмочитов (антителопродуцирующих) клеток уменьшается в 3 раза (до 0,55%), а макрофагов в 1,5 раза (см. рисунок, г). Усиливается деструкция клеток в 1,2 раза, сохраняются нейтрофилы (0,77%).

После 30-суточного космического полета, по сравнению с виварным контролем и наземным экспериментом, в селезенке мышей выявлены еще более резкие изменения в клеточном составе лимфоидной ткани. Установлено, что после космического полета, по сравнению с виварным контролем, в центрах размножения лимфоидных узелков органа число малодифференцированных клеток уменьшается в 2,5 раза, плазматических клеток (в основном плазмочитов) — в 6,6 раза, а макрофагов — в 1,9 раза (см. рисунок, в).

После космического полета, по сравнению с наземным экспериментом, в центрах размножения лимфоидных узелков снижается содержание малодифференцированных клеток (см. рисунок, в): бластов — в 3,9 раза, больших лимфоцитов — в 2,3 раза. В центрах размножения узелков исчезают клетки с фигурами митоза, снижается доля зрелых плазматических клеток в 2,8 раза (см. рисунок, в). Отмечается тенденция увеличения числа деструктивно измененных клеток (в 1,2 раза), тогда как доля макрофагов уменьшается в 1,9 раза. При этом содержание стромальных ретикулярных клеток, средних лимфоцитов и малых лимфоцитов сохраняется на уровне



Относительное содержание клеток в центрах размножения лимфоидных узелков (а, в) и периартериальных лимфоидных муфтах (б, г) селезенки у мышей C57/bl6.

По оси абсцисс — исследованные клетки; по оси ординат — доля клеток (%) от их общего числа на стандартной площади среза, принятого за 100. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

показателей в наземном эксперименте (различия незначимы — см. рисунок, а).

В ПАЛМ после наземного эксперимента и космического полета, по сравнению с виварным контролем, исчезают бласты, отсутствуют клетки с фигурами митоза, а доля больших лимфо-

цитов уменьшается в 2 раза (см. рисунок, г). При этом, по сравнению с виварным контролем, отмечено уменьшение числа плазмцитов в 5,8 раза в наземном эксперименте и в 1,8 раза — после космического полета (см. рисунок, г). На фоне равного содержания малых лимфоцитов в

виварном контроле и в наземном эксперименте после космического полета в ПАЛМ количество малых лимфоцитов уменьшается на 12% (см. рисунок, б). В сравнении с наземным экспериментом после космического полета деструкция клеток еще более усиливается — в 1,6 раза (см. рисунок, б), тогда как содержание макрофагов значимо не изменяется, но уменьшается число зрелых нейтрофилов.

**Обсуждение полученных данных.** В результате проведенного исследования выявлен различный характер реакции клеточного состава лимфоидных зон в селезенке (центров размножения лимфоидных узелков и ПАЛМ) у мышей различных экспериментальных групп. Установлено, что в результате наземного эксперимента, по сравнению с виварным контролем, в селезенке мышей наиболее резкие изменения клеточного состава происходят в ПАЛМ. Они характеризуются усилением деструктивных процессов на фоне снижения макрофагальной активности клеток, подавлением бласттрансформации клеток (исчезают бласты) и снижением активности созревания антителопродуцирующих клеток (плазмоцитов). Комплекс отмеченных изменений в клеточном составе ПАЛМ селезенки у мышей после наземного эксперимента свидетельствует о снижении функциональной активности зоны созревания Т-лимфоцитов, регулирующих клеточный иммунитет в организме [8, 10, 11].

Вместе с тем, установлено, что изменения клеточного состава в центрах размножения лимфоидных узелков селезенки у мышей в наземном эксперименте, по сравнению с виварными показателями, менее выражены, чем в ПАЛМ. В центрах размножения лимфоидных узелков наблюдается только некоторое снижение активности лимфоцитопоеза, что связано с уменьшением числа клеток с фигурами митоза на фоне равного содержания малодифференцированных клеток и уменьшением числа антителопродуцирующих плазматических клеток. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении функциональной активности центров размножения лимфоидных узелков — морфологической зоны созревания В-лимфоцитов, ответственных за формирование гуморального иммунитета у мышей в условиях наземного эксперимента [10, 11].

Анализ перестройки клеточного состава лимфоидной ткани в селезенке у мышей после 30-суточного космического полета, в сравнении с таким же по времени наземным экспериментом, выявил иную реакцию в структурных зонах органа. Несмотря на общий характер снижения функциональной активности лимфоидных струк-

тур в селезенке, наиболее заметные изменения клеточного состава в лимфоидной ткани после космического полета, по сравнению с наземным экспериментом, выявлены в центрах размножения лимфоидных узелков, чем в ПАЛМ. После космического полета в центрах размножения лимфоидных узелков полностью исчезают митозы, что свидетельствует о подавлении лимфоцитопоеза, при этом резко снижаются макрофагальная активность клеток и созревание плазматических клеток. Полученные результаты являются проявлением острой реакции центров размножения лимфоидных узелков и характеризуют снижение гуморального иммунитета после космического полета [5, 11].

При этом установлено, что в ПАЛМ после космического полета, по сравнению с наземным экспериментом, значимо не меняется число макрофагов, в меньшей степени, чем в центрах размножения, уменьшается число больших лимфоцитов и снижена доля плазматических клеток. На основании полученных результатов, можно считать, что после космического полета, по сравнению с наземным экспериментом, в селезенке у мышей ПАЛМ являются более устойчивой морфологической зоной, зоной накопления Т-лимфоцитов, ответственных за клеточный иммунитет. При этом центры размножения лимфоидных узелков в селезенке у мышей являются своеобразной зоной-мишенью, наиболее остро реагирующей на различные факторы космического полета и, в частности, на невесомость [10].

Сходные результаты перестройки клеточного состава в функциональных зонах органов иммунной системы у экспериментальных животных, по сравнению с интактными (виварными) животными, представлены в литературе на других вариантах моделирования невесомости (гипокинезии). Так, у самцов макаков резусов после 30-суточной антиортостатической гипокинезии в  $-5^\circ$  более выраженные изменения отмечены в центрах размножения паховых лимфатических узлов, по сравнению с паракортикальной зоной, которая также является морфологической зоной накопления и дифференцировки Т-клеток в органе [4]. Те же результаты выявлены в брыжеечных лимфатических узлах у крыс при моделировании гипокинезии путем подвешивания животных [2], где центры размножения лимфоидных узелков оказались наиболее уязвимыми структурами, чем паракортикальная зона. В лимфоидных бляшках в этом же эксперименте [3] в центрах размножения лимфоидных узелков отмечены сходные изменения, но перестройка в цитоархитектонике центров размножения лимфоидных узелков менее выра-



жена, чем в отмеченных выше органах. Подобная закономерность отмечается также в селезенке у песчанок после космического полета в течение 14 сут, когда происходит выраженное подавление лимфоцитопоза с исчезновением клеток с фигурами митоза в центрах размножения лимфоидных узелков и более резкое усиление деструкции, чем в ПАЛМ [5].

Вместе с тем, следует отметить, что полученные нами значительные различия в реакции лимфоидных структур селезенки в исследуемых группах мышей (виварный контроль — наземный эксперимент и наземный эксперимент — полетные животные) связаны, видимо, с техническими особенностями содержания мышей в этих экспериментальных группах. Так, группа мышей виварного контроля содержалась в обычных условиях вивария (в обычных клетках и со стандартным питанием), тогда как животные в наземном эксперименте содержались в камерах, в которых в основном развивается гипокинезия [1]. При этом группа полетных животных, помимо воздействия невесомости, подвергались гипергравитации, облучению, т.е. более выраженному стрессу, чем животные в наземном эксперименте. Подобные различия в условиях существования изученных групп экспериментальных животных не могли не отразиться на состоянии и реакции лимфоидной ткани в селезенке, являющейся одним из важнейших органов иммунной системы в организме [8, 10].

Таким образом, исследование реакции структурных зон селезенки у мышей после 30-суточных наземного эксперимента и космического полета выявило различный характер перестройки клеточного состава лимфоидной ткани по сравнению с виварным контролем. На основании полученных результатов и литературных данных, учитывая системный характер реакции лимфоидных (иммунных) органов, можно предполагать вероятность развития функциональной недостаточности всех органов иммуногенеза и возможность развития иммунодефицитного состояния у животных после воздействия экстремальных факторов, в том числе невесомости, в условиях космического полета и гипокинезии, моделируемой в различных экспериментах [8, 10].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев-Андреевский А.А., Шенкман Б.С., Попова А.С. и др. Экспериментальные исследования на мышах по программе полета биоспутника «Бион-М1» // *Авиакосм. и экол. мед.* 2014. Т. 48, № 1. С. 14–27.
2. Гарунова К.А., Григоренко Д.Е., Аминова Г.Г. Реакция брыжеечных лимфатических узлов крыс при моделировании гипокинезии // *Морфология.* 2011. Т. 140, вып. 1. С. 59–61.
3. Григоренко Д.Е., Васянина К.Х. Реакция лимфоидной ткани в стенке 12-перстной кишки и лимфоидной бляшки у крыс при моделировании гипокинезии // *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук.* 2013. № 4 (51). С. 402–406.
4. Григоренко Д.Е., Ерофеева Л.М., Корольков В.И., Сапин М.Р. Длительное воздействие гипокинезии на структурную организацию паховых лимфатических узлов обезьян // *Вестн. новых мед. технологий.* 2005. Т. 12, № 1. С. 19–21.
5. Григоренко Д.Е., Сапин М.Р. Перестройка лимфоидных структур селезенки у песчанок после космического полета // *Морфология.* 2012. Т. 142, вып. 4. С. 67–71.
6. Григорьев А.И., Ильин Е.А. Животные в космосе // *Вестн. Росс. акад. наук.* 2007. Т. 77, № 11. С. 963–973.
7. Козловская И.Б. Механизмы влияния невесомости на системы управления жизнеобеспечения организма // *Тез. докл. Междунар. конф. по физиологии мышечной деятельности.* М.: Изд-во СИП РИА, 2002. С. 10–15.
8. Константинова И.В. Система иммунитета в экстремальных условиях // *Проблемы косм. биол.* М.: Наука, 1989. Т. 59.
9. Ларина И.М. Космический полет и регуляция метаболизма у человека. М.: Наука, 2004.
10. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: Джангар, 2000.
11. Gray D. Understanding germinal centre // *Res. Immunol.* 1991. Vol. 142. P. 236–242.

Поступила в редакцию 15.11.2014

#### CHARACTERISTICS OF THE REACTIONS OF THE SPLEEN LYMPHOID STRUCTURES IN MICE IN A TERRESTRIAL EXPERIMENT AND AFTER A PROLONGED SPACEFLIGHT

D. Ye. Grigorenko, M. R. Sapin, L. M. Yerofeyeva

Morphometric methods were used to examine the cell composition of the germinal centers of lymphoid nodules and periarteriolar lymphoid sheaths (PALS) in male C57/bl6 mice aged 19–20 weeks after 30-day-long space flight, simulation of space flight factors in a terrestrial experiment and in vivarium control group. After a ground-based experiment, compared to vivarium control, the functional activity of morphological zone of T lymphocyte maturation was decreased in PALM. In the germinal centers of lymphoid nodules of mice subjected to a ground-based experiment, lymphocytopoiesis and cell blast transformation, that characterize the morpho-functional activity of this zone and humoral immunity, remained unchanged. After a spaceflight, as compared with ground-based experiment, the changes of cell composition were less expressed in PALS than in the in the germinal centers of lymphoid nodules. It is concluded that PALS are more stable morphological zones, while the germinal centers of lymphoid nodules in the spleen are specific «target zones», most sensitive to a variety of factors of a space flight.

**Key words:** *spleen, cell composition, lymphoid structures, spaceflight, mouse*

Laboratory of Functional Anatomy, RAS Research Institute of Human Morphology, Moscow