

© Д.Е.Григоренко, 2015
УДК 611.41.018:612.014.482:599.323.4

Д.Е.Григоренко

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕГКОИЗОТОПНОЙ ВОДЫ И ОБЛУЧЕНИЯ

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

Изучена перестройка клеточного состава лимфоидной ткани селезенки через 7, 15 и 30 сут после облучения в дозе 50 рад у мышей BALB/c, длительно употреблявших дистиллированную воду или легкоизотопную воду. Установлен неравномерный характер изменения клеточного состава селезенки на протяжении эксперимента. На 7-е сутки после облучения в структурных зонах селезенки у мышей отмечается резкое снижение количества бластных форм и клеток с картинами митоза, что отражает более низкий уровень лимфоцитопоза, а также усиление деструкции клеток при употреблении легкоизотопной воды. К 30-м суткам опыта отмечается различная реакция лимфоидных структур в органе. В периартериальных лимфоидных муфтах процессы восстановления клеточного состава более выражены, чем в центрах размножения лимфоидных узелков, что указывает на усиление клеточного иммунитета в организме и иммуномодулирующие свойства «легкой» воды у мышей в отдаленные сроки постлучевого периода.

Ключевые слова: селезенка, лимфоидные структуры, клеточный состав, облучение, легкая (легкоизотопная) вода

В настоящее время продолжается активный поиск средств, снижающих повреждающее действие ионизирующих облучений на организм человека [3, 9], что особенно важно для обеспечения радиационной безопасности экипажа космонавтов [8, 9, 11]. Экспериментальные исследования последних лет показали, что использование легкоизотопной воды (воды, очищенной от дейтерия) до облучения животных увеличивает выживаемость животных, предотвращает снижение их массы, восстанавливает гемопоэз и может применяться как средство, замедляющее процессы старения [2, 3, 5], что указывает на выраженные радиопротекторные свойства «легкой» воды [6, 8, 9]. Отмечено, что употребление легкоизотопной воды усиливает продукцию аденозинтрифосфата в клетках и повышает энергетические ресурсы организма [9, 12], в связи с чем применение ее в клинической практике дает положительный эффект при лечении многих видов заболеваний (онкологических, почечно-каменной болезни, колита и др.) [11, 12]. Значительный интерес представляет изучение воздействия легкоизотопной воды на органы иммуногенеза. Однако в литературе практически нет сведений, касающихся морфофункционального состояния органов иммунной системы при действии легкоизотопной воды в условиях облученного организма. В связи с этим

целью данного исследования являлось изучение перестройки клеточного состава лимфоидной ткани селезенки у мышей после длительного употребления легкоизотопной воды с последующим гамма-облучением в 50 рад.

Материал и методы. Экспериментальная часть работы выполнена на базе Института медико-биологических проблем (ИМБП) РАН. Для получения воды с пониженным содержанием дейтерия (дейтерия и кислорода ^{18}O) использовали метод ректификации [7] на лабораторной установке ИМБП РАН. Содержание дейтерия в легкоизотопной воде по результатам лазерной спектроскопии составило 35 ppm. Полученная вода максимально очищена от солей и других примесей, поэтому наиболее адекватным контролем для легкоизотопной воды в данном случае является дистиллированная вода, в которой отсутствуют соли [4, 5].

Эксперимент проведен на мышах-самцах Balb/c 3-месячного возраста. Изучены 2 группы животных. 1-я (подопытная) группа мышей в течение 2 мес в свободном доступе получали легкоизотопную воду. Мыши 2-й (контрольной) группы 2 мес получали дистиллированную витаминизированную воду. После употребления легкоизотопной и дистиллированной воды проводили облучение животных в ИМБП РАН на установке РХ-у-30. Экспериментальных животных подвергали гамма-облучению ^{60}Co дважды по 25 рад — в суммарной дозе 50 рад, что составляет 0,5 Гр. Мощность дозы составляла 0,32 сантиГр/мин. После облучения мыши продолжали принимать легкоизотопную и дистиллированную витаминизированную воду до периода забоя.

Спустя 7, 15 и 30 сут после окончания облучения, животные выведены из эксперимента методом цервикальной дис-

Сведения об авторе:

Григоренко Дина Ефремовна (e-mail: dinagrigorenko@yahoo.com), лаборатория функциональной анатомии, Научно-исследовательский институт морфологии человека РАН, 117418, Москва, ул. Цюрупы, 3

локации в соответствии с приказом № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР «Об утверждении Правил проведения с использованием экспериментальных животных» от 13.11.1984 г. Программа экспериментов рассмотрена и одобрена комиссией по биоэтике ИМБП РАН.

В эксперименте использованы по 10 мышей в каждой группе (всего 60 особей). Селезенку фиксировали в 10% формалине, проводили по спиртам возрастающей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы органа толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином — эозином, азуром II — эозином. Под микроскопом DM2500 (Leica, Германия) изучали качественный и количественный клеточный состав лимфоидных структур селезенки мышей (центров размножения лимфоидных узелков и периартериальных лимфоидных муфт — ПАЛМ) на единице площади гистологического среза (в 880 мкм²). Проведена статистическая обработка цифрового материала по программе «Statistika 6.0» и Excel. Значимыми считали различия при $P < 0,05$.

Результаты исследования. У мышей на 7-е сутки после облучения в центрах размножения лимфоидных узелков и ПАЛМ при употреблении легкоизотопной воды содержание молодых клеток, особенно бластов, и количество клеток с картинами митозов меньше (в 4,1–5,0 и в 2,8–2,9 раза соответственно), чем при употреблении дистиллированной воды (рисунки, а, б).

Доля деструктивно измененных клеток в этот срок опыта в центрах размножения лимфоидных узелков значимо выше при употреблении легкой воды, чем дистиллированной воды ($10,8 \pm 1,2$ и $22,3 \pm 1,9\%$ соответственно; см. рисунок, а, б). В ПАЛМ доля этих клеток сохраняется на примерно одном уровне в изучаемых группах мышей ($10,2 \pm 1,1$ и $12,5 \pm 1,3\%$, различия незначимы). При этом в подопытной и контрольной группах мышей в центрах размножения лимфоидных узелков отмечается равное содержание плазмобластов (по 0,70%), малых лимфоцитов ($12,3 \pm 1,0$ и $10,2 \pm 0,9\%$) и макрофагов (различия незначимы) (см. рисунок, а, б). При употреблении легкой воды на 7-е сутки после облучения в ПАЛМ выявлены незрелые и зрелые плазматические клетки ($1,10 \pm 0,10\%$ плазмобластов и $0,30 \pm 0,10\%$ плазмочитов), которые отсутствуют при употреблении дистиллированной воды. В ПАЛМ после действия легкой воды отмечается большее содержание малых лимфоцитов на 6,5%, а макрофагов в 1,6 раза при равном уровне деструктивно измененных клеток в изучаемых группах животных (различия незначимы, см. рисунок, в, г).

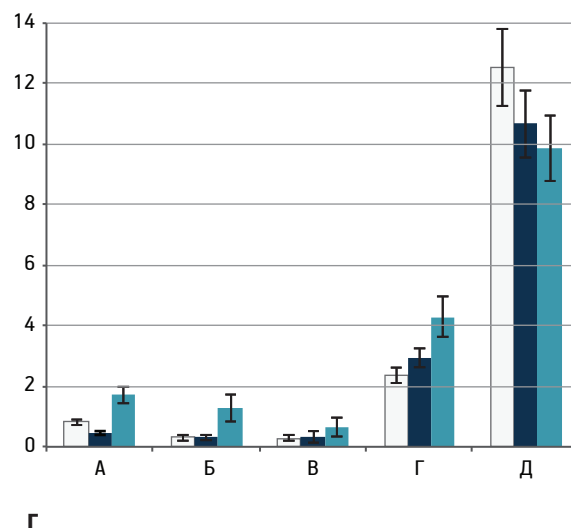
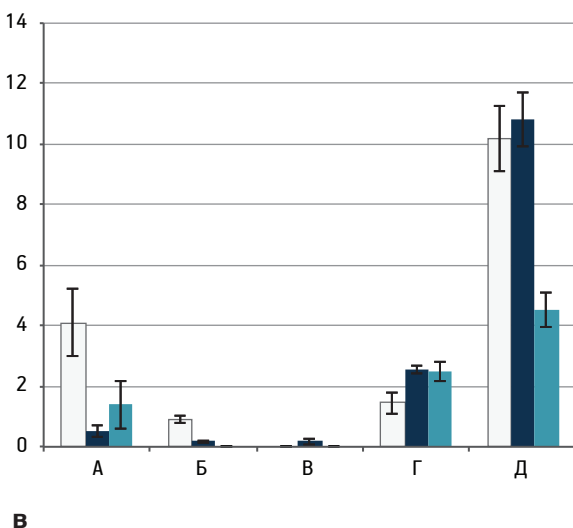
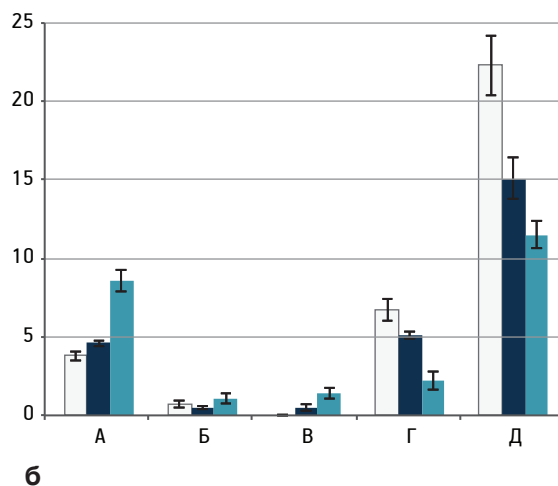
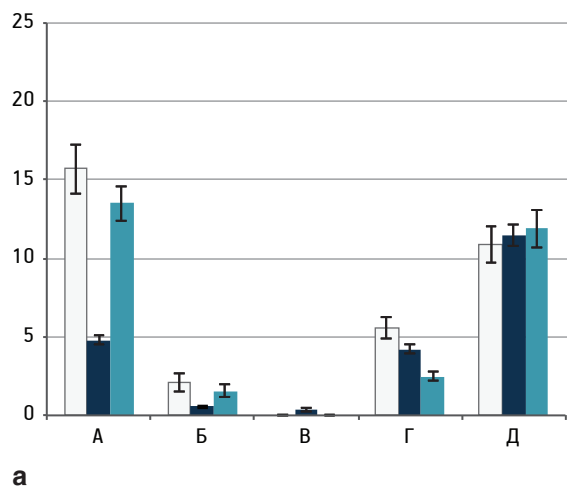
Спустя 15 сут после облучения мышей после употребления легкой и дистиллированной воды в центрах размножения лимфоидных узелков и ПАЛМ выравниваются показатели содержания бластов (различия незначимы, см. рисунок, в, г). При этом число клеток с картинами митозов в

ПАЛМ в 1,8 раза больше при употреблении легкой воды, чем дистиллированной (различия значимы). В изучаемых зонах органа после употреблении легкой воды на фоне уменьшения числа незрелых форм плазматических клеток значимо увеличивается доля зрелых (антителопродуцирующих) плазматических клеток, особенно в ПАЛМ (в 1,9 раза) и меньше — в центрах размножения лимфоидных узелков (в 1,5 раза).

Наряду с этим, на 15-е сутки после облучения в подопытной группе мышей при употреблении легкоизотопной воды, в центрах размножения лимфоидных узелков и ПАЛМ содержание малых лимфоцитов превышает контрольные показатели в 2,0 и 1,2 раза ($11,9 \pm 1,0$ и $24,7 \pm 1,9\%$ малых лимфоцитов в центрах размножения; 39 ± 3 и $43 \pm 3\%$ в ПАЛМ соответственно, различия значимы). В этот срок опыта после действия легкой воды в центрах размножения лимфоидных узелков отмечается более высокое число разрушающихся клеток (в 1,3 раза, $P < 0,05$), тогда как в ПАЛМ их число значимо не отличается от контрольных значений. Та же закономерность отмечается и в соотношении макрофагов, число которых значимо (в 1,2 раза) превышает контрольное значение в центрах размножения узелков при употреблении легкой воды, незначимые их различия — в ПАЛМ в изучаемых группах ($2,50 \pm 0,10$ и $2,9 \pm 0,3\%$ соответственно).

В отдаленный период, спустя 30 сут после гамма-облучения мышей, в центрах размножения лимфоидных узелков после употребления легкой воды содержание молодых форм клеток меньше, чем при употреблении дистиллированной воды. Однако в этот период в ПАЛМ в подопытной группе мышей выявлено в 1,3 раза больше бластных форм и обнаружены клетки с картинами митозов, отсутствующие в контроле (см. рисунок, в, г). В этот период в центрах размножения лимфоидных узелков сохраняются плазматические клетки ($1,4 \pm 0,3\%$), которые полностью исчезают в контрольной группе. В ПАЛМ число этих клеток в 3,3 раза больше, чем при употреблении дистиллированной воды, в том числе сохраняются антителопродуцирующие (зрелые) плазматические клетки ($0,60 \pm 0,10\%$), отсутствующие в контроле (различия значимы при $P = 0,05$).

На 30-е сутки после облучения, по сравнению с 7-ми и 15-ми сутками опыта, при употреблении легкой и дистиллированной воды в ПАЛМ и центрах размножения лимфоидных узелков показатели деструкции клеток постепенно снижаются. Исключение составляют показатели деструкции при употреблении дистиллированной воды в центрах размножения лимфоидных узелков, где во все



Срок после окончания облучения, сут: □ 7 ■ 15 ■ 30

Клеточный состав центров размножения лимфоидных узелков (а, б) и периартериальных лимфоидных муфт (в, г) в селезенке у мышей после употребления дистиллированной (а, в) и легкоизотопной (б, г) воды и облучения в 50 рад.

По оси абсцисс — виды клеток: А — бласты; Б — митотически делящиеся; В — плазмочиты; Г — макрофаги; Д — деструктивно измененные; по оси ординат — доля клеток (%). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

сроки опыта число деструктивно измененных клеток незначимо колеблется в небольших пределах (от $10,8 \pm 1,2$ до $11,9 \pm 0,7\%$). В большей степени число разрушенных клеток уменьшается в ПАЛМ при употреблении дистиллированной воды (в 1,9 раза). При употреблении легкоизотопной воды деструкция клеток наиболее активно снижается (в 2,0 раза) в центрах размножения лимфоидных узелков (от $22,3 \pm 1,9$ на 7-е сутки до $11,5 \pm 0,8\%$ на 30-е сутки) и значительно меньше — в ПАЛМ (в 1,3 раза). В ПАЛМ на фоне снижения деструкции клеток число макрофагов в 1,7 раза больше при употреблении легкой воды, чем дистиллированной (см. рисунок, в, г, различия значимы).

Обсуждение полученных данных. Результаты исследования показали, что после гамма-облучения мышей (в 50 рад) при употреблении ими легкоизотопной и дистиллированной воды на протяжении всех сроков эксперимента (от 7 до 30 сут) происходит перестройка клеточного состава морфофункциональных зон селезенки.

Установлено, что при приеме легкоизотопной воды на 7-е сутки после облучения лимфоцитопоз ниже, чем после употребления дистиллированной воды. Это подтверждается более низким содержанием митотически делящихся клеток, бластов и более высоким уровнем деструкции клеток.

Заметная перестройка клеточного состава структурных зон селезенки после облучения происходит с 15-х суток эксперимента. Установлено, что на 15-е сутки после облучения при употреблении легкой воды в ПАЛМ в большей степени, чем в центрах размножения лимфоидных узелков, увеличивается доля бластов, клеток с картинами митозов и плазмочитов, что свидетельствует об опережающем восстановлении функциональной активности ПАЛМ. Увеличение числа отмеченных видов клеток в ПАЛМ после употребления легкой воды связано, видимо, с усилением притока малодифференцированных клеток по микроциркуляторному руслу, где происходит их дальнейшая трансформация в зрелые клетки, которые способны к иммунному ответу [7].

На 30-е сутки опыта отмечена дальнейшая перестройка клеточного состава лимфоидных зон органа. Так, в ПАЛМ после употребления легкоизотопной воды преобладающее содержание молодых клеток и клеток с картинами митозов связано с более активными процессами лимфоцитопоеза по сравнению с таковыми при применении дистиллированной воды [7]. Важным показателем состояния местного иммунитета является высокое содержание в изучаемых структурных зонах селезенки плазматических клеток у животных, употреблявших легкую воду, при полном отсутствии этих клеток у получавших дистиллированную воду, что свидетельствует об активном уровне иммуноцитопоеза и усилении реакций гуморального иммунитета в органе в отдаленные сроки после облучения [3, 10]. Результаты исследования показали также, что после употребления легкой воды в изученных зонах селезенки число молодых форм клеток и клеток с картинами митозов от 7-х к 30-м суткам опыта увеличивается, что указывает на усиление лимфоцитопоеза в пострадикационный период [7, 11].

Вместе с тем, установлено, что наиболее уязвимой морфологической зоной в селезенке в отдаленные сроки после облучения животных (на 30-е сутки) при употреблении легкой воды являются центры размножения лимфоидных узелков. Полученные результаты показали, что при употреблении легкоизотопной воды в результате перестройки клеточного состава в центрах размножения лимфоидных узелков содержание клеток с картинами митозов и бластных форм, характеризующих состояние лимфоцитопоеза в органе, значительно меньше, чем при употреблении дистиллированной воды.

После употребления легкоизотопной воды наиболее выраженные процессы восстановления клеточной структуры от 7-х до 30-х суток отме-

чаются в ПАЛМ. Полученные результаты согласуются с данными А.А.Ярилина [10] о том, что при облучении животных в органах иммуногенеза В-клетки более радиочувствительны по сравнению с Т-клетками. Выявлено, что наиболее значительный эффект воздействия легкой воды проявляется в ПАЛМ на 30-е сутки после облучения, в период, когда процессы лимфоцитопоеза и созревания антителопродуцирующих плазматических клеток протекают значительно активнее, чем при действии дистиллированной воды. Известно, что при радиационном воздействии в органах иммунной системы усиливаются процессы деструкции клеток с последующим уменьшением количества малых лимфоцитов [7, 10]. Настоящее исследование показало, что наиболее стабильной популяцией клеток в ПАЛМ селезенки являются именно малые лимфоциты. Стабилизирующим фактором популяции малых лимфоцитов в ПАЛМ, вероятно, является воздействие легкой воды. Полученные результаты согласуются с данными других авторов [1, 6], отметивших, что при употреблении легкой воды уже на 3-и сутки после облучения мышей низкими дозами (в 25 рад) клеточный состав тимуса и его функциональная активность восстанавливаются быстрее, чем в селезенке. Исходя из литературных и собственных данных, отмеченное усиление процессов восстановления в ПАЛМ, по сравнению с центрами размножения лимфоидных узелков при приеме легкой воды после высоких доз облучения (50 рад), связано, видимо, с активным поступлением в селезенку Т-лимфоцитов из тимуса.

Таким образом, исследование показало, что в отдаленные сроки пострадикационного периода (через 30 сут) восстановление морфофункционального состояния структурных зон селезенки протекает более активно при употреблении легкоизотопной воды, чем при дистиллированной, что свидетельствует о ее иммуномодулирующих свойствах. Установлено, что в селезенке у мышей зона созревания Т-клеток (ПАЛМ) является более устойчивой к облучению, чем зона созревания В-клеток, что связано с усилением клеточного иммунитета в организме в отдаленные сроки после облучения при употреблении легкоизотопной воды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерофеева Л.М., Федоренко Б.С., Раков Д.В. Структурно-функциональная характеристика тимуса облученных мышей, употреблявших питьевую воду с низким содержанием дейтерия // Научные труды I съезда физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 19–23 сентября 2005 г.). В 2 т. М.: Медицина-Здоровье, 2005. С. 123–124.

2. Иванов А. А., Ушаков И. Б., Куликова Е. И. и др. Легкоизотопная вода — средство лечения острой лучевой болезни // *Авиакосмич. и экол. мед.* 2013. Т. 47, № 5. С. 40–44.
3. Куликова Е. И., Крючкова Д. М., Северюхин Ю. С. и др. Радиомодифицирующие свойства воды с пониженным содержанием дейтерия и тяжелых изотопов кислорода // *Авиакосмич. и экол. мед.* 2012. Т. 40, № 6. С. 45–50.
4. Патент РФ № 2295493 Способ и установка для производства легкой воды / С. П. Соловьев. Заявка от 20.03.2007 г. БИ. 2007. № 8. С. 27–31.
5. Раков Д. В. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия и кислорода ^{18}O на развитие лучевых повреждений в организме мелких лабораторных животных при низких дозах облучения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2007.
6. Раков Д. В., Ерофеева Л. М., Григоренко Д. Е. и др. Модулирующее влияние легкой воды на развитие повреждения при низких суммарных дозах гамма-облучения // *Материалы Всерос. конф. «Радиобиологические основы лучевой терапии»*. М.: изд. РУДН, 2005. С. 11.
7. Сапин М. Р., Никитюк Д. Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: Джангар, 2000.
8. Синяк Ю. Е., Гайдамынов В. Б., Покровский Б. Г. Получение и использование бездейтериевой воды в условиях длительных космических экспедиций // *Авиакосмич. и экол. мед.* 1999. № 1. С. 56–59.
9. Тимаков А. А., Смирнов В. М., Гусаров Е. А. Повышение иммунитета естественным путем. М.: Наука, 2003.
10. Ярилин А. А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999.
11. Bild W., Stefanescu I., Haulica I. et al. Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water // *Rom. J. Physiol.* 1999. Vol. 36, № 3–4. P. 205–218.
12. Somlyai G. The biological effect of deuterium-depleted water. A possible new tool in cancer therapy // *Anticancer Res. Int. J.* 2001. Vol. 21, № 3A. P. 23–33.

Поступила в редакцию 20.12.2014
Получена после доработки 14.04.2015

PECULIARITIES OF THE CELLULAR COMPOSITION OF SPLENIC LYMPHOID TISSUE IN MICE AFTER LONG-TERM USE OF LIGHT WATER AND IRRADIATION

D. Ye. Grigorenko

The changes of the cellular composition of splenic lymphoid tissue were studied 7, 15 and 30 days after irradiation with a dose of 50 rad, in BALB/c mice which received either distilled water or light (deuterium-depleted) water for a long time prior to and after irradiation. The irregular pattern of changes of splenic cellular composition was observed during the experiment. It was found that at day 7 after irradiation, the splenic structural zones in mice demonstrated a sharp decrease in the number of blast forms and mitotic cells, reflecting a lower level of lymphocytopoiesis, as well as an increased cellular destruction in mice consuming light water. By day 30 of the experiment, different responses of lymphoid structures were observed in the organ. In the periarteriolar lymphoid sheaths, the processes of cellular composition regeneration were more pronounced than in the germinal centers of lymphoid nodules, indicating the enhancement of body cell-mediated immunity and immunomodulating properties of light water in mice at later dates of post-irradiation period.

Key words: *spleen, lymphoid structures, cellular composition, irradiation, light water*

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