

© Г.Г.Аминова, 2015
УДК 611.343.018:599.323.4

Г.Г.Аминова

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ СОБСТВЕННОЙ ПЛАСТИНКИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЩЕЙ КИШКИ У МЫШЕЙ C57BL/6 В ПЕРИОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

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

Исследована тощая кишка у мышей C57 BL/6 через 7 сут после 30-суточного полета в космосе (n=5) и при виварном контроле (n=6). Гистологическими и морфометрическими методами изучен клеточный состав собственной пластинки слизистой оболочки ворсинок и области крипт. Установлено, что на 7-е сутки полного восстановления состава лимфоидной ткани кишки не происходит. В ворсинках снижено число средних и малых лимфоцитов, плазматических клеток. В области крипт изменения менее выражены. В собственной пластинке у экспериментальных животных увеличено число больших лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов, разрушающихся клеток и клеток стромы. Количество эозинофилов уменьшается.

Ключевые слова: тощая кишка, слизистая оболочка, собственная пластинка, клетки, космический полет

Активное изучение космического пространства ставит новые задачи перед космической медициной для сохранения здоровья будущих астронавтов [9]. Для обеспечения длительных полетов разрабатываются новые программы по усовершенствованию условий жизнеобеспечения человека и животных. В частности, одной из таких программ явилось создание биоспутника «Бион-М1», запущенного с мышами на борту [2].

На пребывание человека и животных в условиях околоземной орбиты реагируют все системы организма, а после завершения полета резистентность организма некоторое время остается сниженной, что непосредственно связано с состоянием иммунной системы [5, 7]. Подавляющее большинство работ, посвященных ее изучению у субъектов, побывавших в космосе, имеют физиологическую направленность [6, 7, 9], значительно меньше морфологических исследований [3, 4], хотя именно строение лимфоидных органов и их структур определяет физиологические показатели иммунной системы. Условия космоса требуют особенностей жизнеобеспечения человека (животных), в частности, приема и состава пищи (корма), обладающей специфическими физическими свойствами, что не может не оказывать влияния на состояние стенки кишечника, в том числе и на его иммунокомпетентные лимфоидные структуры [1, 10]. Однако неизвестно, в какие сроки после приземления происходит восстановление первоначальной структуры органов пищева-

рения и их лимфоидной ткани. В связи с этим целью данного исследования явилось изучение клеточного состава собственной пластинки слизистой оболочки тощей кишки у мышей после завершения длительного космического полета.

Материал и методы. По программе полета «Бион-М1» [2] исследованы 2 группы мышей-самцов C57BL/6 в возрасте 4–5 мес. В первую (контрольную) группу входили 6 мышей, которых содержали в стандартных условиях вивария. Вторая (полетная) группа животных (n=5) была исследована на 7-е сутки после завершения 30-суточного полета на биоспутнике. Различия в содержании животных заключались и в получаемом ими корме. Мыши контрольной группы в свободном доступе питались стандартным сухим гранулированным кормом. Экспериментальная группа мышей в период полета получала пастообразный корм, приготовленный из стандартного комбикорма, в состав которого были введены вода (76–78%) и казеин в качестве загустителя. Эвтаназию осуществляли методом цервикальной дислокации, одобренной комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН ГНЦ РФ. Фрагменты начального отдела тощей кишки фиксировали в 10% нейтральном формалине, после обезвоживания заливали в парафин, срезы толщиной 5 мкм окрашивали азуром II — эозином (для проведения цитологического анализа) и гематоксилином — эозином (БиоВитрум, Россия) (для обзорного изучения). Исследовали клеточный состав собственной пластинки слизистой оболочки в центральной части ворсинок (СПВ) и между криптами (СПК). Клетки лимфоидного, фибробластического ряда, макрофаги, а также гранулоциты и клетки, находящиеся в состоянии деструкции, подсчитывали под микроскопом Leica DM 2500 (Leica, Швейцария) при об. 100, ок. 10, для чего использовали 25-узловую сетку (с шагом 10 мкм), вмонтированную в окуляр микроскопа.

Сведения об авторах:

Аминова Гульшат Гареевна (e-mail: lab-funkanat@yandex.ru), лаборатория функциональной анатомии, Научно-исследовательский институт морфологии человека, 117418, Москва, ул. Цюрупы, 3

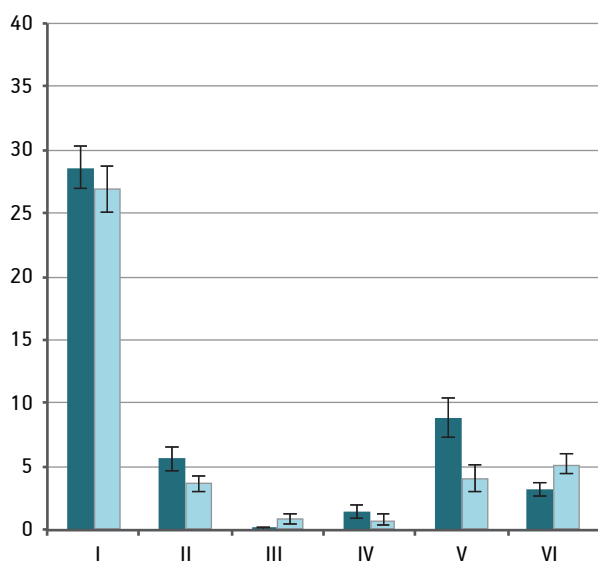
Определяли абсолютное и относительное содержание (в %) всех клеток на стандартной площади гистологического среза, равной 880 мкм². Статистический анализ содержания клеток осуществляли с использованием программного обеспечения Statistica 6. и Excel. Различия считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Работу с мышами проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, 18 марта 1986 г.) [13], а также с приказом № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 13.11.1984 г.

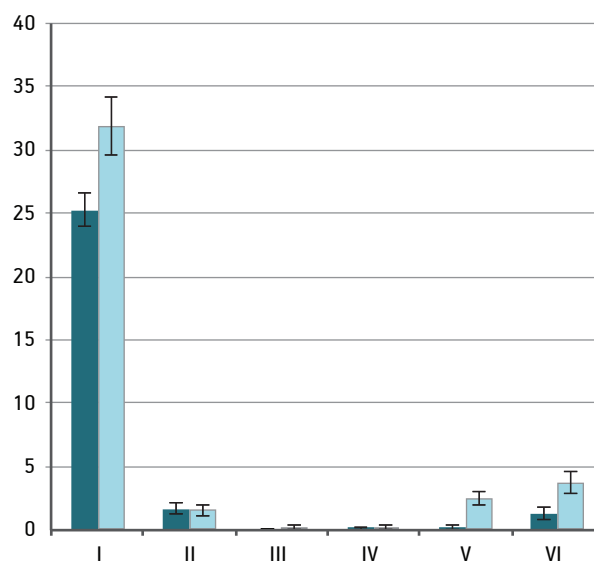
Результаты исследования. Анализ клеточного состава СПВ у контрольных животных показал, что на стандартной площади среза располагается $41,2 \pm 1,9$ клетки. Самыми многочисленными среди них являются малые лимфоциты (рисунок), которые составляют около $1/3$ от всех клеток ($12,0 \pm 1,0$ клетка в абсолютном выражении или $28,6 \pm 1,7\%$ от общего числа клеток). Значительно меньше содержится плазмоцитов и плазмобластов — $10,31\%$, при этом доминируют плазмоциты ($3,3 \pm 0,5$ клетки или $8,9 \pm 1,6\%$), плазмобласты встречаются в 6 раз реже ($0,53 \pm 0,21$ клетки или $1,4 \pm 0,5\%$). Изредка встречаются сегментоядерные нейтрофилы ($0,73 \pm 0,20$ или $1,8 \pm 0,5\%$). Эозинофилы в СПВ у контрольных животных также редки ($0,40 \pm 0,21$ клетки или $0,9 \pm 0,5\%$). Процесс деструкции клеток у живот-

ных контрольной группы выражен слабо. На стандартной площади среза присутствует всего $1,33 \pm 0,22$ разрушающихся клеток ($3,2 \pm 0,5\%$ от всего клеточного состава). Чрезвычайно редко встречаются большие лимфоциты ($0,07 \pm 0,06$ клетки). Бластные формы и делящиеся клетки не обнаружены.

В СПК у контрольной группы животных на стандартной площади среза насчитывается $40,1 \pm 1,6$ клетки. Основную их часть ($66,6 \pm 1,5\%$) составляют клетки стромы ($26,8 \pm 1,3$ клетки). Четверть клеток ($25,3 \pm 1,4\%$) приходится на малые лимфоциты ($10,2 \pm 0,7$ клетки). Средних лимфоцитов содержится в 15 раз меньше, чем малых лимфоцитов ($0,67 \pm 0,18$ или $1,7 \pm 0,5\%$). В отличие от СПВ, в СПК плазматические клетки встречаются крайне редко (см. рисунок). Как плазмобластов, так и плазмоцитов насчитывается всего по $0,07 \pm 0,06$ клетки на стандартной площади среза ($0,16 \pm 0,15$ и $0,18 \pm 0,17\%$ соответственно). Малочисленную группу также составляют нейтрофилы ($1,33 \pm 0,26$ клетки или $3,5 \pm 0,8\%$). Еще реже встречаются эозинофилы ($0,40 \pm 0,16$ или $1,0 \pm 0,4\%$) и макрофаги ($0,07 \pm 0,06$ или $0,18 \pm 0,17\%$). Процесс деструкции клеток в СПК кишки у контрольной группы животных также



а



б

■ Виварный контроль ■ Период восстановления

Относительное содержание клеток лимфоидного ряда в собственной пластинке слизистой оболочки центральной части ворсинок (а) и в области крипт (б) тощей кишки у мышей C57 BL/6 контрольной группы и через 7 сут после орбитального полета (период восстановления).

По оси абсцисс клетки: I — малые лимфоциты; II — средние лимфоциты; III — большие лимфоциты; IV — плазмобласты; V — плазмоциты; VI — деструктивно измененные клетки; по оси ординат — доля исследованных клеток (%). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

выражен слабо ($0,53 \pm 0,19$ деструктивно измененных клеток или $1,3 \pm 0,5\%$).

Через 7 сут после приземления у животных, побывавших в космосе, отмечаются изменения в клеточном составе как СПВ, так и СПК.

В СПВ общее количество клеток на стандартной площади среза у экспериментальных животных равно $36,2 \pm 0,8$. В основном это клетки стромы, на которые приходится половина присутствующих здесь клеток ($18,3 \pm 0,8$ клетки или $50,5 \pm 2,2\%$). Малые лимфоциты составляют четвертую часть клеток СПВ ($9,8 \pm 0,7$ или $7,0 \pm 1,8\%$). Средние лимфоциты встречаются в 7 раз реже, их доля равна $3,7 \pm 0,7\%$ ($1,33 \pm 0,24$ клетки на стандартной площади среза). Плазматические клетки представлены в основном плазмочитами ($1,5 \pm 0,4$ клетки или $4,1 \pm 1,1\%$), а их незрелых форм (плазмобластов) всего $0,8 \pm 0,5\%$ (или $0,27 \pm 0,15$ клетки). Среди клеток в СПВ встречаются нейтрофилы, на долю которых приходится $6,9 \pm 1,2\%$ ($2,5 \pm 0,4$ клетки). Эозинофилы практически отсутствуют ($0,07 \pm 0,06$ или $0,20 \pm 0,20\%$). Несколько чаще отмечаются макрофаги ($0,27 \pm 0,11$ клетки или $0,8 \pm 0,3\%$) и клетки, находящиеся в состоянии деструкции ($1,87 \pm 0,26$ или $5,2 \pm 0,8\%$).

На 7-е сутки после приземления животных в СПК насчитывается $36,0 \pm 1,8$ клетки на стандартной площади среза. Среди них половину составляют стромальные ($18,5 \pm 1,2$ клетки или $51,8 \pm 2,9\%$). Менее многочисленными являются малые лимфоциты, на долю которых приходится $31,9 \pm 2,3\%$ ($11,6 \pm 1,2$ клетки). Средние лимфоциты встречаются гораздо реже: $0,60 \pm 0,18$ на стандартной площади среза ($1,6 \pm 0,5\%$). Плазматические клетки также являются редкими элементами и представлены, главным образом, плазмочитами ($0,93 \pm 0,22$ клетки или $2,5 \pm 0,6\%$). Плазмобласты практически отсутствуют ($0,07 \pm 0,06$ или $0,17 \pm 0,17\%$). Другие гранулоциты — нейтрофилы, представленные преимущественно сегментоядерными клетками, встречаются в большем количестве. На стандартной площади среза их насчитывается $2,5 \pm 0,5$ клетки ($7,2 \pm 1,4\%$). Макрофаги представлены всего $0,27 \pm 0,11$ клетками и составляют $0,66 \pm 0,29\%$ от общего числа клеток. Доля клеток, находящихся в состоянии деструкции, у животных, побывавших в длительном орбитальном полете, равна $3,8 \pm 0,9\%$ ($1,33 \pm 0,28$ на стандартной площади среза).

Обсуждение полученных данных. Исследование клеточного состава собственной пластинки слизистой оболочки тощей кишки у мышей через 7 сут после орбитального полета показало, что в сравнении с контрольными животными полного восстановления клеточных

популяций ни в ворсинках, ни в области крипт не происходит. Эти данные согласуются с результатами исследований, полученными после полета животных (крыс, монгольских песчанок) на биоспутниках «Космос-782» и «Фотон-М3» [3, 4].

Как показали наши исследования, в СПВ кишки сниженными оказались абсолютные показатели содержания средних (в 1,6 раза) и малых лимфоцитов (1,2 раза). При этом изменения относительного содержания этих клеток мало отличаются от изменений абсолютных показателей. Аналогичные результаты были получены в крови космонавтов после 18-суточного полета [11]. В СПВ у экспериментальных животных число больших лимфоцитов после приземления животных оказывается выше контрольных показателей (в 4,7 раза), но при этом их доля среди клеток СПВ в 7,5 раза ниже показателей у животных контрольной группы. На 7-е сутки восстановления животных отмечаются сниженные абсолютные показатели содержания и плазматических клеток: плазмобластов (в 2 раза), плазмочитов (в 2,2 раза). Аналогичным образом изменяются и относительные показатели содержания этих клеток. Уменьшение количества плазматических клеток в ворсинках может быть объяснено ускоренной деструкцией этих клеток, а также торможением процессов трансформации клеток, косвенным подтверждением чего служит невысокое содержание в ворсинках средних лимфоцитов и плазмобластов. Уменьшенное содержание лимфоцитов и плазматических клеток в ворсинках у животных, побывавших в космосе, является свидетельством неполного восстановления лимфоидной ткани спустя 7 сут после их приземления, что согласуется с данными других исследователей [8]. В то же время, увеличение абсолютного количества больших лимфоцитов можно расценивать как благоприятный фактор, способствующий восстановлению клеточных популяций. Отсутствие в СПВ бластных форм и митотически делящихся клеток при пониженном содержании средних лимфоцитов позволяет высказать предположение о задержке в ворсинках процессов бласттрансформации [11, 14]. Подавление бластогенной активности лимфоцитов было отмечено и у космонавтов после космических полетов, что связывали с отсутствием гравитационного вектора [14].

В области крипт разница в содержании лимфоцитов в контрольной группе мышей и на 7-е сутки после длительного пребывания в космосе менее выражена, чем в ворсинках. Количество средних и малых лимфоцитов у экспериментальных животных практически достигает контрольных показателей. Доля малых лимфоцитов даже

несколько увеличивается (в 1,2 раза). Появляется небольшое количество больших лимфоцитов, которые отсутствовали у контрольных животных. Содержание плазмобластов не отличается от такового в контроле, но количество плазмоцитов в 13,3 раза превосходит показатели в контрольной группе (в 14 раз в процентном выражении). Это свидетельствует об усилении местного иммунитета в стенке тощей кишки спустя 7 сут после приземления животных.

Изменения количества гранулоцитов одинаковы как в СПВ, так и СПК. Число эозинофилов на 7-е сутки восстановления животных после полета в этих зонах тощей кишки оказывается в 5,7 раза ниже контрольных показателей (относительное содержание в 4,5 и 5,9 раза соответственно). Количество нейтрофилов в стенке кишки после полета, наоборот, оказывается увеличенным: в ворсинках — в 3,5 раза (относительное содержание — в 4 раза), а в области крипт — в 1,9 раза (относительное содержание — в 2 раза). Увеличение числа нейтрофилов отмечено также в селезенке у крыс после полета на биоспутнике «Космос-782» [4]. У человека на 7-е сутки после длительного космического полета отмечалось повышение фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов, при этом синтез цитокинов снижался [8]. Имеются также данные, свидетельствующие, что в наземных экспериментах на людях активность нейтрофилов снижается, уменьшается титр лизоцима [11]. В целом, исследователи отмечают значительное ослабление иммунной защиты организма человека в период пребывания в условиях космического полета и после приземления [5, 7, 8]. Это сопровождается усилением вирулентности экзогенной и эндогенной микрофлоры [12], что увеличивает риск развития инфекционных заболеваний различной этиологии [7, 8].

На 7-е сутки после приземления животных по сравнению с контрольной группой в исследованных зонах тощей кишки наблюдается повышенное число клеток с отеком цитоплазмы и кариолизисом. В ворсинках деструктивно измененных клеток несколько больше, чем в области крипт. Однако в ворсинках у экспериментальных животных число разрушающихся клеток по сравнению с таковым у контрольных мышей больше в 1,4 раза, а в области крипт — в 2,5 раза. Меньшее количество разрушающихся клеток в ворсинках, вероятнее всего, связано с более благоприятными условиями для резорбции погибающих клеток, а также продуктов их распада и активной всасывающей функцией в лимфатическое русло. Макрофаги как в ворсинках, так и в области крипт кишки, встречаются нечасто. Их количество после приземле-

ния животных увеличивается: в ворсинках — в 2 раза, в области крипт — в 3,8 раза. Увеличение числа этих клеток, как и нейтрофилов, вероятнее всего, обусловлено деструктивными процессами, которые продолжаются в стенке кишки и после полета и, возможно, изменениями пристеночного слоя слизи и активизацией населяющей кишку микрофлоры [8, 12].

Клетки стромы, представленные в собственной пластинке слизистой оболочки кишки, главным образом, фибробластами и фиброцитами, являются доминирующими. На их долю у контрольных и экспериментальных животных приходится в СПР половина клеток, а в СПК — более половины. У животных, побывавших в космосе, по сравнению с контрольной группой количество этих клеток в СПК оказывается несколько уменьшенным (в 1,3 раза), в СПВ оно не снижается.

Отсутствие полного восстановления лимфоидной ткани в собственной пластинке слизистой оболочки тощей кишки у мышей C57BL/6 спустя 7 сут после 30-суточного орбитального полета можно объяснить повторным стрессом, испытываемым животными в период приземления, а также необходимостью их адаптации к новым условиям существования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аминова Г.Г., Григоренко Д.Е. Слизистая оболочка полых внутренних органов и ее роль в иммунных процессах // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2012. Т. 43, № 8. С. 27–31.
2. Андреев-Андреевский А.А., Шенкман Б.С., Попова А.С. и др. Экспериментальные исследования на мышах по программе полета биоспутника «Бион-М1» // Авиакосм. экол. мед. 2014. Т. 48, № 1. С. 14–27.
3. Атякин Д.М., Быков Э.Г., Ильин Е.А. и др. Состояние интерстиция тощей кишки монгольских песчанок после полета на космическом аппарате «Фотон-М3» // Авиакосм. экол. мед. 2012. Т. 46, № 3. С. 8–13.
4. Дурнова Г.И. Сравнительное исследование лимфоидных органов крыс, находившихся во время космического полета в условиях невесомости и искусственной силы тяжести // Арх. анат. 1978. Т. 75, вып. 11. С. 41–47.
5. Ильин Е.А. К 40-летию первого полета биоспутника «Бион» // Авиакосм. экол. мед. 2013. Т. 47, № 4. С. 67–68.
6. Константинова И.В. Система иммунитета в экстремальных условиях. Космическая иммунология // Проблемы космической биологии. М.: Наука, 1988.
7. Пономарев С.А., Рыкова М.П., Антропова Е.Н. и др. Состояние системы врожденного иммунитета у человека в условиях 5-суточной «сухой» иммерсии // Авиакосм. экол. мед. 2011. Т. 45, № 3. С. 17–23.
8. Пономарев С.А., Антропова Е.Н., Берендеева Т.А. и др. Особенности изменений показателей врожденного иммунитета при воздействии на организм человека неблаго-

- приятных факторов длительного космического полета // Авиакосм. экол. мед. 2013. Т. 47, № 4. С. 123–124.
9. Потапов А. Н., Синяк Ю. Е., Петров В. М. Проблемы медико-биологического обеспечения межпланетных экспедиций // Авиакосм. экол. мед. 2013. Т. 47, № 1. С. 55–60.
10. Сапин М. Р., Никитюк Д. Б. Лимфатическая система и ее важнейшая роль в иммунных процессах. М.: Медицинская книга, 2014.
11. Фукс Б. Б., Константинова И. В. Цитохимия иммуногенеза в ординарных и экспериментальных условиях. М.: Медицина, 1973.
12. Aviles Y., Belay T., Fountain K. et al. Increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection under hindlimb-unloading conditions // J. Appl. Physiol. 2003. Vol. 95, № 1. P. 73–80.
13. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 18.III.1986.
14. Taylor G. R., Dardano J. R. Human cellular immune responsiveness following space flight // Aviat. Space Environ. Med. 1982. Vol. 54, Suppl. 1. P. 55–59.

Поступила в редакцию 03.05.2015

CELLULAR COMPOSITION OF THE LAMINA PROPRIA OF JEJUNAL MUCOUS MEMBRANE IN C57BL/6 MICE DURING THE RECOVERY PERIOD AFTER PROLONGED SPACE FLIGHT

G. G. Aminova

The jejunum of C57 BL/6 mice (n=5) was examined 7 days after a 30-day-long space flight and in vivarium control animals (n=6). The cellular composition of the lamina propria of the mucous membranes of the villi and crypt region was studied using histological and morphometric methods. It was found that on Day 7 the recovery of normal cellular composition of the lamina propria was incomplete. In the villi, the number of medium and small lymphocytes, as well as of the plasma cells was reduced. In the crypt region, the changes were less pronounced. In the lamina propria in experimental animals the number of large lymphocytes, macrophages, neutrophils, disintegrating cells and stromal cells was increased. The number of eosinophils was reduced.

Key words: *jejunum, mucous membrane, lamina propria, cells, space flight*

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