

© Г. Г. Аминова, М. Р. Сапин, Л. М. Ерофеева, 2015
УДК 611.343.018.73:599.323.4

Г. Г. Аминова, М. Р. Сапин, Л. М. Ерофеева

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТЧНОГО СОСТАВА СОБСТВЕННОЙ ПЛАСТИНКИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЩЕЙ КИШКИ У МЫШЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ УСЛОВИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

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

Изучали клеточный состав собственной пластинки слизистой оболочки тощей кишки в ворсинках (СПВ) и между криптами (СПМК). Исследовали 2 группы мышей-самцов С57/BL6 в возрасте 4–5 мес. Экспериментальная группа животных (n=8) в наземных условиях в течение 30 сут находилась в блоках «БИОС-МЛЖ» и получала пастообразный корм, приготовленный из стандартного комбикорма, содержащего воду и казеин. Контрольная группа животных (n=6) содержалась в стандартных условиях вивария и получала стандартный сухой гранулированный корм. Исследования показали, что в наземном эксперименте существенных изменений в содержании лимфоцитов в СПВ и СПМК не происходит. Для СПВ характерно резкое снижение числа плазматических клеток. В СПВ и СПМК повышается количество эозинофилов, уменьшается содержание малодифференцированных форм клеток (бластов и больших лимфоцитов). Высказано предположение, что изменения в содержании разных видов клеток в наземном эксперименте обусловлены не только ограничением подвижности животных, но и разным составом получаемого корма.

Ключевые слова: тощая кишка, лимфоидная ткань, моделирование условий космического полета

При проведении наземных экспериментальных исследований, воспроизводящих условия содержания и среды обитания при космических полетах на биоспутнике «Бион-М1» [1], было обнаружено, что многие физиологические показатели у животных претерпевают существенные изменения [2, 7, 9]. Более ранние исследования выявили, что пребывание животных в условиях космического полета приводит к изменениям практически всех систем, включая иммунную [4, 5]. Так как диффузные скопления лимфоидной ткани присутствуют в стенке пищеварительного тракта, то изучение изменений ее состава в связи с условиями полета и особенностями питания при микрогравитации представляет не только теоретический интерес, но весьма важно и для практической (космической) медицины. Поэтому цель данного исследования — изучение изменений клеточного состава собственной пластинки слизистой оболочки кишки под влиянием искусственно созданных на Земле условий космического полета (наземный эксперимент).

Материал и методы. По программе полета биоспутника «Бион-М1» [1] исследовали 2 группы мышей-самцов С57/BL6 в возрасте 4–5 мес, свободных от патогенной микрофлоры. В 1-ю группу были включены 8 животных, которые в наземных условиях в течение 30 сут находились в блоках «БИОС-МЛЖ», установленных в климатических камерах,

где воспроизводили условия содержания и среды обитания, существующие на биоспутнике (температура, влажность, газовый состав атмосферы) в период пребывания его в космосе (наземный эксперимент). Животные 2-й группы (6 мышей) были контрольными — их содержали в обычных условиях вивария. Мыши контрольной группы в свободном доступе получали стандартный сухой гранулированный корм, а животные экспериментальной — пастообразный корм, приготовленный из стандартного комбикорма, в состав которого были введены вода (76–78%) и казеин в качестве загустителя [6]. Эвтаназию животных осуществляли через 12 ч методом цервикальной дислокации (одобрена комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ — Института медико-биологических проблем РАН). Фрагменты начального отдела тощей кишки мышей фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином — эозином и для проведения цитологического анализа азуром II — эозином (БиоВитрум, Россия). Исследовали клеточный состав собственной пластинки слизистой оболочки кишки в центральной части ворсинок (СПВ) и между криптами (СПМК). Клетки лимфоидного ряда, гранулоциты, фибробласты подсчитывали под микроскопом Leica DM 2500 (Leica, Германия) при об. 100, ок. 10 (масляная иммерсия). Для подсчета клеток использовали 25-узловую сетку (с шагом 10 мкм), вмонтированную в окуляр микроскопа. Учитывали абсолютное количество всех клеток на единице площади гистологического среза, равной 880 мкм², и определяли их относительное содержание (%). Статистический анализ количественного содержания клеток осуществляли с использованием программного обеспечения Statistica 6.0 и Excel. Различия показателей считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Сведения об авторах:

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

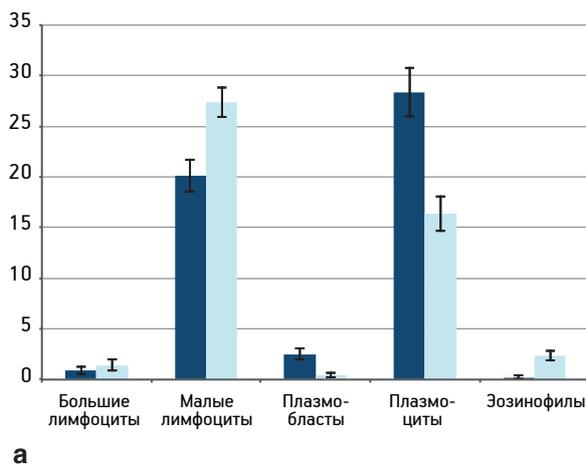
Работу с мышами проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.) [11], а также с приказом № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 13.11.1984 г.

Результаты исследования. Анализ клеточного состава СПВ у животных контрольной группы показал, что на исследуемой стандартной площади среза содержится 64 ± 4 клетки. Значительная часть клеток представлена малыми лимфоцитами — $20,1 \pm 1,6\%$ или $13 \pm 1,5$ клетки (рисунок, а).

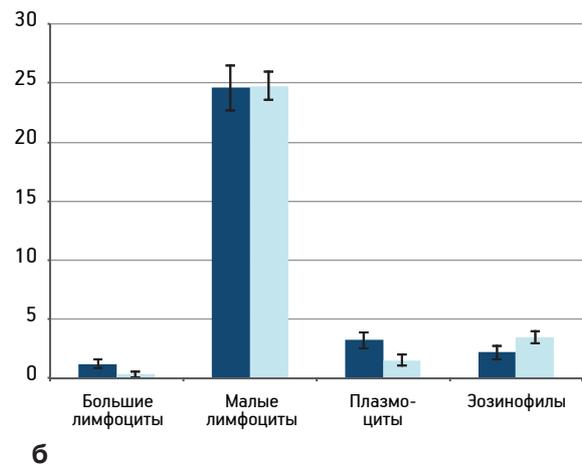
На средние лимфоциты приходится $5,9 \pm 0,7\%$ ($3,7 \pm 0,4$ клетки). Большие лимфоциты, и особенно бласты, в СПВ составляют лишь $0,9 \pm 0,4\%$ или $0,53 \pm 0,23$ — больших лимфоцитов и $0,07 \pm 0,06$ — бластов. Обращает на себя внимание весьма высокое содержание плазматических клеток (см. рисунок, а). В сумме плазмобласты и плазмциты составляют практически половину всех клеток СПВ. Среди них преобладают плазмциты, которых содержится в 11 раз больше, чем плазмобластов (см. рисунок, а), плазмциты — $17,6 \pm 1,6$, плазмобластов — $1,7 \pm 0,4$ клетки. В СПВ наблюдается значительное содержание нейтрофилов ($3,0 \pm 0,5\%$ или $1,80 \pm 0,25$ клетки). Эозинофилы (см. рисунок, а) встречаются в 13 раз реже, чем нейтрофилы. Значительную группу в СПВ представляют стромальные клетки (фибробласты, фиброциты, ретикулярные клетки). Они составляют более $1/3$ от всех клеток, присутствующих в СПВ ($34,3 \pm 1,7\%$ или $22,2 \pm 2,1$ клетки). Среди

клеток лимфоидного ряда в СПВ значительное место занимают деструктивно-измененные клетки ($4,3 \pm 0,6\%$ или $2,7 \pm 0,4$ клетки). Их цитоплазма находится в состоянии отека, отмечается кариолизис. Несмотря на значительное содержание разрушающихся клеток, доля макрофагов в СПВ относительно небольшая ($0,23 \pm 0,15\%$).

В СПМК у мышей контрольной группы на стандартной площади среза располагаются $40,5 \pm 2,1$ клеток. Почти четвертую часть из них составляют малые лимфоциты (см. рисунок, б), их $10,1 \pm 1,1$ на стандартной площади среза. На долю средних лимфоцитов приходится $2,4 \pm 0,4\%$ ($1,07 \pm 0,20$ клетки). Значительно реже между криптами встречаются большие лимфоциты (см. рисунок, б), их насчитывается всего $0,47 \pm 0,13$ клетки. Бластные формы клеток лимфоидного ряда очень редки ($0,12 \pm 0,12\%$ или $0,07 \pm 0,06$ клетки). Нередко обнаруживаются плазмциты (см. рисунок, б). На стандартной площади среза их $1,27 \pm 0,26$ клетки. Плазмобласты практически отсутствуют. Гранулоциты, представленные нейтрофилами и эозинофилами, составляют значительную часть клеток СПМК ($5,2 \pm 0,9$ и $2,2 \pm 0,6\%$ или $2,1 \pm 0,4$ и $0,87 \pm 0,23$ клетки соответственно). Доминирующими клетками в этой области являются фибробласты, фиброциты, ретикулярные клетки. На их долю приходится $57,4 \pm 1,8\%$ от общего числа клеток (или $23,3 \pm 1,2$ клетки). Здесь же встречаются клетки, находящиеся в состоянии деструкции ($3,3 \pm 0,6\%$ или $1,27 \pm 0,22$ клетки). У мышей контрольной группы в СПМК макрофаги практически отсутствуют.



а



б

■ Контроль ■ Наземный эксперимент

Относительное содержание различных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки тощей кишки у мышей C57BL/6 в контроле (интактные животные) и при искусственно созданных на Земле условиях космического полета (наземный эксперимент).

а — в ворсинке; б — между криптами. По оси абсцисс — виды клеток; по оси ординат — относительное содержание клеток (%). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

При моделировании условий космического полета (наземный эксперимент) в клеточном составе СПВ происходят изменения. Общее число клеток на стандартной площади среза уменьшается в 1,2 раза ($51,6 \pm 2,2$ клеток), но при этом количество больших и средних лимфоцитов практически сохраняется. Доля малых лимфоцитов увеличивается (см. рисунок, а), их количество $14,1 \pm 1,0$ клетки). Средних лимфоцитов насчитывается почти в 5 раз меньше, чем малых ($5,5 \pm 0,9\%$ или $3,0 \pm 0,5$ клетки). Больших лимфоцитов (см. рисунок, а) на стандартной площади среза — $0,73 \pm 0,27$, а бластные формы полностью исчезают. Среди плазматических клеток в СПВ преобладают зрелые формы (плазмобластов — $0,27 \pm 0,11$, плазмочитов — $8,8 \pm 1,2$ клетки на стандартной площади среза) (см. рисунок, а). Абсолютное количество и относительное содержание нейтрофилов по сравнению с контролем не меняется. В то же время в СПВ увеличивается доля эозинофилов (см. рисунок, а). Их количество — $1,13 \pm 0,23$ клетки. Относительное содержание разрушающихся клеток в СПВ увеличивается до $5,6 \pm 0,6\%$, но при этом показатели их абсолютного количества остаются неизменными (эксперимент — $2,80 \pm 0,25$, контроль — $2,7 \pm 0,4$ клетки). Макрофаги в СПВ при наземном эксперименте практически полностью исчезают.

В СПМК в условиях наземного эксперимента увеличение количества клеток на стандартной площади среза незначимо ($42,8 \pm 1,2$ клетки), количество фибробластов и нейтрофилов — $24,3 \pm 0,8$ и $2,5 \pm 0,5$ клетки или $57,1 \pm 1,6$ и $6,0 \pm 1,1\%$ соответственно, эозинофилов $1,47 \pm 0,21$ клетки или $3,5 \pm 0,5\%$. Относительное содержание клеток, находящихся в состоянии деструкции, составляет $4,4 \pm 0,7\%$ или $1,93 \pm 0,29$ клетки. Абсолютные и относительные показатели количества средних и малых лимфоцитов стабильны (см. рисунок, б). Малых лимфоцитов содержится $24,7 \pm 1,2\%$ или $10,7 \pm 0,7$ клетки, средних лимфоцитов — $2,4 \pm 0,4\%$ или $1,07 \pm 0,20$ клетки. Однако отмечается уменьшение доли больших лимфоцитов (см. рисунок, б). Их количество — $0,13 \pm 0,09$ клетки на стандартной площади среза, полностью исчезают бластные формы. Среди плазматических клеток при наземном эксперименте встречаются только зрелые формы — плазмочиты ($1,5 \pm 0,5\%$ или $0,67 \pm 0,20$ клетки).

Обсуждение полученных данных. Сравнительный анализ клеточного состава СПВ и СПМК в контрольной группе мышей показал его отличительные локальные особенности. СПВ содержит в 1,5 раза больше клеток, чем СПМК. Другой особенностью СПВ тощей кишки

у мышей контрольной группы является очень высокий показатель количества плазматических клеток, главным образом, плазмочитов, которые в СПВ обнаруживаются почти в 14 раз чаще, чем между криптами, а их доля среди всех исследованных клеток СПВ в 9 раз выше, чем в СПМК. Присутствие большого количества плазматических клеток в собственной пластинке слизистой оболочки свидетельствует о высоком уровне гуморального иммунитета, особенно в области ворсинок. Вероятнее всего, это явление объясняется близостью начального отдела тощей кишки к двенадцатиперстной кишке, где происходит резкое изменение рН среды, и на первый план выходит антигенное воздействие пищевых масс. В СПВ, по сравнению с областью крипт, содержится также большее количество малых лимфоцитов (в 1,3 раза), но при этом их доля среди остальных клеток оказывается в 1,2 раза меньше, чем в области крипт. В СПВ в 3,4 раза чаще, чем в области крипт, встречаются и средние лимфоциты. Их доля в 1,2 раза больше, что, возможно, связано с процессами трансформации этих клеток в плазмобласты. В контрольной группе мышей в СПВ значительно выражена деструкция клеток (в 2 раза), чем в собственной пластинке, расположенной между криптами, что, вероятно, объясняется близким контактом ворсинок с химусом и активацией процессов всасывания.

У мышей контрольной группы СПМК отличается от СПВ более высоким содержанием гранулоцитов, абсолютное количество нейтрофилов в 1,15 раза, эозинофилов в 6,7 раза, относительное содержание нейтрофилов в 1,7, а эозинофилов в 9,5 раза больше, чем в СПВ. Между криптами у мышей, находящихся при виварном содержании, отмечается более высокая доля (в 1,7 раза) клеток стромы (фибробластов, фиброцитов, ретикулярных).

Сопоставление строения начального отдела стенки тощей кишки у экспериментальных и контрольных мышей не выявило существенных различий, что согласуется с данными других исследователей [6]. Однако детальный анализ клеточного состава собственной пластинки слизистой оболочки тощей кишки показал существенные изменения содержания ряда клеток, происходящие в процессе моделирования условий космического полета животных.

При наземном эксперименте, имитирующем полет животных в космосе, в СПВ отмечается некоторое уменьшение общего содержания клеток (в 1,2 раза), что совпадает с данными, полученными при исследовании двенадцатиперстной кишки в экспериментах с гипокинезией [3]. Наше

исследование показало, что в СПВ при наземном эксперименте изменений количества лимфоцитов (бластов, больших, средних и малых), а также разрушающихся клеток (в отличие от такового при гипокинезии) не происходит. Доли больших и малых лимфоцитов несколько увеличиваются (в 1,6 и 1,4 раза соответственно). На фоне общей сохранности числа лимфоцитов в СПВ обращает на себя внимание резкое уменьшение плазматических клеток (в 2,1 раза в абсолютных цифрах и в 1,8 раза — относительного содержания). Данные литературы свидетельствуют, что эксперименты с 30-суточной гипокинезией у крыс также приводят к значительному снижению в ворсинках двенадцатиперстной кишки доли (в 8,5 раза) плазматических клеток [3]. Возможно, что в наземных экспериментах с созданием условий космического полета, когда животные находятся в условиях капсул, изменения количества плазматических клеток в собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки в какой-то степени связаны и с ограничением их подвижности. Однако основной причиной уменьшения числа этих клеток все же, видимо, является торможение процессов трансформации лимфоцитов. Аналогичные картины были отмечены у космонавтов после их приземления, связанные с замедлением (или прекращением) процессов бластогенеза [9, 13]. Не исключено, что усиление моторики тощей кишки, имеющей место при моделировании условий невесомости [2], также может оказывать влияние на содержание плазматических клеток в СПВ. Добавление в состав корма экспериментальных животных белка казеина, обладающего аллергенными свойствами [12], может служить причиной увеличения числа эозинофилов как в СПВ (в 8,7 раза абсолютного количества и в 10,4 раза относительного содержания), так и в собственной пластинке слизистой оболочки между криптами кишки. Проведенные нами исследования показали, что создание наземных условий космического полета не влияет на количество нейтрофилов, расположенных в собственной пластинке слизистой оболочки кишки. Тем не менее, данные литературы свидетельствуют, что в крови у людей при наземном эксперименте активность нейтрофилов снижается [9]. Пребывание животных в блоках «БИОС-МЛЖ» приводит к небольшому, но значимому уменьшению в СПВ числа клеток стромы (в 1,16 раза). При этом относительное содержание этих клеток во столько же раз увеличивается.

В СПМК в условиях наземного эксперимента изменений числа средних и малых лимфоцитов, а также клеток стромы не происходит. Однако в 3,8 раза уменьшается доля и в 3,6 раза абсолют-

ное количество больших лимфоцитов, что также свидетельствует в пользу замедления процессов трансформации лимфоцитов. В области крипт, как и в СПВ, отмечается рост числа эозинофилов (в 1,6 раза относительного содержания и в 1,7 раза абсолютного количества). Увеличивается количество разрушающихся клеток.

Полученные данные об изменениях клеточного состава собственной пластинки слизистой оболочки тощей кишки у мышей при наземном эксперименте, имитирующем условия космического полета, свидетельствуют о снижении местного гуморального иммунитета в стенке органа, что может явиться причиной развития инфекционных процессов [8–10].

Итак, анализ клеточного состава СПВ и СПМК тощей кишки у мышей C57/BL6 позволяет высказать предположение, что количественные изменения клеток при наземном эксперименте обусловлены не только ограничением подвижности животных, но также связаны с составом, консистенцией и консервацией получаемого ими корма.

При этом более чувствительными структурами кишки являются ворсинки, в которых в значительном количестве исчезают плазматциты. При этом в исследованных зонах кишки отмечается увеличение числа эозинофилов, что может расцениваться как проявление аллергической реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев-Андриевский 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.
2. Афонин Б.В., Седова Е.А., Гончарова Н.П. и др. Эвакуаторная функция желудочно-кишечного тракта в условиях 5-суточной иммерсии // *Авиакосм. экол. мед.* 2011. Т. 45, № 6. С. 52–57.
3. Гарунова К.А. Лимфоидная ткань в стенках 12-перстной кишки крыс при воздействии гипокинезии // *Материалы III Междунар. науч. конф. «Актуальные проблемы спортивной морфологии и генетики человека», посвящ. памяти проф. А.П. Акифьева.* М.: изд. МГАФК-МосГУ, 2009. С. 57–59.
4. Григоренко Д.Е. Последствия воздействия микрогравитации на лимфоидную (иммунную) ткань селезенки песчанок после космического полета. Современные проблемы гуманитарных и естественных наук // *Материалы XI Междунар. науч.-практ. конф. М.: Спецкнига, 2012.* С. 34–37.
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. Медникова Е.И., Гурьева Т.С., Дадашева О.А. и др. Разработка пастообразного корма для экспериментов с мышами на борту автоматических космических аппаратов // *Авиакосм. экол. мед.* 2014. Т. 48, № 4. С. 53–56.

7. Пономарев С. А., Антропова Е. Н., Берендеева Т. А. и др. Особенности изменений показателей врожденного иммунитета при воздействии на организм человека неблагоприятных факторов длительного космического полета // *Авиакосм. экол. мед.* 2013. Т. 47, № 4. С. 123–124.
8. Пономарев С. А., Рыкова М. П., Антропова Е. Н. и др. Состояние системы врожденного иммунитета человека в условиях 5-суточной «сухой» иммерсии // *Авиакосм. экол. мед.* 2011. Т. 45, № 3. С. 17–23.
9. Фукс Б. Б., Константинова И. В. Цитохимия иммуногенеза в ординарных и экстремальных условиях. М.: Медицина, 1973.
10. Шилов В. А., Земляничная Е. П., Борисова О. К. Исследование биологических свойств *Cl.perfringens* типа Ф, выделенных у людей в условиях пребывания в герметической камере // *Космич. биол. и авиакосмич. мед.* 1976. Т. 10, № 3. С. 71–75.
11. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 18.III.1986.
12. Kurek M., Przybilla B., Hermann K., Ring J. A naturally occurring opioid peptide from cow's milk, beta-casomorphine-7, is a direct histamine releaser in man // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1992. Vol. 97, № 2. P. 115–120.
13. Taylor C. R., Dardano Y. R. Human cellular immune responsiveness following space flight // *Aviat. Space Environ. Med.* 1983. Vol. 54. Suppl. № 1. P. 55–59.

Поступила в редакцию 17.11.2014
Получена после доработки 20.03.2015

CHARACTERIZATION OF THE CELLULAR COMPOSITION OF THE MUCOSAL LAMINA PROPRIA OF THE JEJUNUM IN MICE SUBJECTED TO THE CONDITIONS SIMULATING LONG-DURATION SPACEFLIGHT

G. G. Aminova, M. R. Sapin, L. M. Yerofeyeva

The cellular composition of the lamina propria of the mucous membrane of the jejunum was examined in the villi (LPV) and between the crypts (LPC). Two groups of male C57/BL6 mice aged 4–5 months were studied. Experimental group of animals (n=8) for 30 days was living under the terrestrial conditions in «BIOS-SLA» blocks and received a paste-like food made with standard feed containing water and casein. The control group of animals (n=6) were kept in standard vivarium conditions and received standard dry pellets. Studies have shown no significant changes in the content of lymphocytes in LPV and LPC in a terrestrial experiment. LPV was characterized by a sharp reduction in the number of plasma cells. In both LPV and LPC the number of eosinophils was increased, while the content of low differentiated forms of cells (blasts and large lymphocytes) was decreased. It is suggested that the changes in the contents of different cell types in ground-based experiment were due not only to the limited mobility of the animals but also to different composition of the feed.

Key words: *jejunum, lymphoid tissue, space flight condition simulation*

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