

## БИОИНФОРМАЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО СТАТУСА ТОНКОЙ КИШКИ В ОТДАЛЕННОМ ПОСТРАДИАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

З.А. Воронцова, В.В. Шишкина

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко»  
Минздрава России, г. Воронеж, Россия

Представленные экспериментальные исследования направлены на изучение иммунного компонента слизистой оболочки тощей кишки как наиболее активного отдела тонкой кишки, где с наибольшей выраженностью происходят процессы пристеночного, мембранного и внутриклеточного пищеварения, реализующие гомеостаз на уровне всего организма. Изменения, происходящие после общего  $\gamma$ -облучения в малых дозах, приводили к снижению барьерно-защитных функций. Необходимо отметить, что пролонгированный пострadiaционный период не приводит к восстановлению структурных компонентов, несмотря на то, что некоторые из них возвращались к исходному состоянию. Морфофункциональные изменения характеризовались барьерным дисбалансом показателей светооптической плотности сиаломуцинового геля и щелочной фосфатазы, тучноклеточной популяции на фоне сильных корреляционных связей, включающих во взаимодействие митотические клетки и интраэпителиальные лимфоциты. Таким образом, наблюдалось функциональное взаимодействие и тучные клетки проявляли радиопротективный эффект. О неблагополучии гомеостаза свидетельствовало наличие в эпителии М-клеток и лимфоцитарного инфильтрата, а также лимфоцитарно-плазмочитарного инфильтрата – в субэпителиальном слое с формированием лимфоидных узелков, констатирующих усиление антителогенеза.

*Ключевые слова:* слизистая оболочка тощей кишки, малые дозы, лимфоидная ткань,  $\gamma$ -облучение.

© Z.A. Vorontsova, V.V. Shiskina, 2014

Bioinformatic Characterization of the Immune Status of the Small Intestine in the Late Post-radiation Period

The experimental research is focused on the study of the immune component of the mucous membrane of the jejunum as the most active part of the small intestine, where the greatest manifestation parietal, membrane and intracellular digestion take place, realizing homeostasis in the whole organism. Changes occurring after the general  $\gamma$ -irradiation in small doses, led to a decrease in the barrier-protective functions. It should be noted that prolonged postradiation period does not restore the structural components, although some of them are returned to the original state. Morphological changes were characterized by an imbalance of the barrier performance light-optical density of sialomucin gel and alkaline phosphatase, mast cell population in the background of strong correlations involving the interaction of mitotic cells and intraepithelial lymphocytes. Thus, the observed functional interaction and mast cells showed radioprotective effect. About troubles of homeostasis indicated the presence of the M-cells and lymphocytic infiltrate in the epithelium and lymphocytic-plasmocytic infiltration - in the subepithelial layer with the formation of lymphoid nodules, demonstrated the increased antibody response.

*Keywords:* the mucous membrane of the jejunum, small doses, lymphoid tissue,  $\gamma$ -irradiation.

### Введение

В настоящее время проблема воздействия радиации малых доз нашла отражение в документах ведущих международных организаций в области исследования лучевых эффектов и радиационной защиты. Необходимость обобщения накопившихся за последние 1.5–2 десятка лет экспериментальных и эпидемиологических данных в области малых доз совершенно очевидно стала объективной в связи с развитием атомной энергетики. Несмотря на серьезные достижения по обеспечению радиационной безопасности, сохраняется потенциальная возможность облучения больших групп населения при случайных радиационных инцидентах или преднамеренной враждебной инициации таких ситуаций, определяю-

щих профессиональное вмешательство при ликвидации последствий.

Весьма актуальным в настоящее время представляется направление по изучению компонентов иммунной системы, участвующих на всех этапах онтогенеза в защитных реакциях на воздействие факторов различной природы, в том числе радиационной, обеспечивающих структурную и функциональную целостность организма. Одним из крупных периферических отделов иммунной системы является кишечнорастворимая лимфоидная ткань. Иммунные структуры, ассоциированные со слизистой оболочкой – иммунологически активная ткань тонкой кишки расценивается как барьерная, способная оказать защиту в случае антигенного воздействия. Иммунные реакции могут индуцировать процессы восстановления, защиты и радиорезистент-

ности. Именно лимфоциты получили статус главных клеток, обеспечивающих иммунный процесс и специфичность иммунных реакций. Есть наглядные доказательства участия лимфоцитов в запуске пролиферации, сопровождения любых морфогенетические процессы и детерминации характер дифференцировки клеток. Динамичность модифицирующих эффектов отдаленных последствий воздействия ионизирующей радиации диапазона малых доз  $\gamma$ -облучения не представлена в современной литературе на уровне иммунного статуса тощей кишки. В связи с этим позиция совершенствования и фундаментальности исследований в этой области имеет наибольший потенциал с точки зрения формирования неспецифической резистентности, снижения неопределенностей оценок риска, является научно обоснованной в условиях отдаленных последствий  $\gamma$ -облучения малыми дозами для выявления защитных механизмов барьерных образований слизистой оболочки тощей кишки. Процессы восстановления и закономерности их проявления являются исключительно важными, требующими новых биоинформационных решений на уровне иммунных реакций и будут способствовать развитию новых подходов в клеточной терапии.

Целью исследования является оценка иммунного статуса слизистой оболочки тощей кишки после воздействия общего однократного и фракционированного  $\gamma$ -излучения с широким диапазоном параметров малых доз и отдаленных сроков наблюдения.

### Материал и методы исследования

Исследование проведено на 477 белых беспородных половозрелых крысах-самцах в возрасте 4 месяцев к началу эксперимента. Животных подвергали общему равномерному однократному и фракционированному (пятикратному)  $\gamma$ -облучению со спектром 1.2 МэВ на установке «Хизотрон» ( $^{60}\text{Co}$ ). При фракционированном облучении суммарная доза была распределена в течение пяти суток и представляла возрастающий диапазон экспозиционных доз от 10 до 100 сГр и также при однократном с мощностью 50 сГр/ч. Пострадиационный период наблюдения составил 180; 365; 545 и 730 сут. При оценке радиационного эффекта отдаленных последствий была рассчитана поглощенная доза, эквива-

лентная экспозиционной, измеряемая в зивертах (Зв), при низких дозах облучения в отдаленные сроки.

В соответствии с планом эксперимента было сформировано 53 группы, в том числе группы возрастного контроля.

Материалом для исследования служили проксимальные фрагменты тощей кишки размером 1.3–1.5 см, извлеченные на расстоянии 12–15 см от желудка. Для проведения морфологических и иммуногистохимических исследований тощую кишку фиксировали в растворе Беккера и 10% растворе нейтрального формалина, с последующей стандартной гистологической проводкой и заливкой в гомогенизованную парафиновую среду. Формировали и маркировали парафиновые блоки, затем изготавливали микротомные срезы толщиной 6 мкм. Для обзорных целей препараты слизистой оболочки окрашивали гематоксилином и основным коричневым, позволяющим описать рельеф, охарактеризовать эпителий и строю субэпителиального слоя с сосудистым компонентом и тучными клетками.

На стандартных срединных парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином, при увеличении  $\times 900$  подсчитывали количество интраэпителиальных лимфоцитов (ИЭЛ) в 20 продольно срезанных ворсинках, т.е. подсчет производили на площади, ограниченной одинаковым числом эпителиальных клеток. Учитывая гетерогенность ИЭЛ определяли их количественное распределение в соответствии с топографическими особенностями в нижней, средней и верхней третях ворсин для характеристики и оценки процесса миграции. Визуально рассматривали лимфоцитарно-плазмоцитарный инфильтрат субэпителиального слоя при окраске толудиновым синим и по Романовскому–Гимза для характеристики иммунного ответа. При окраске альциановым синим по Сидмену (1950) с использованием программы Image J, определяли светооптическую плотность сиаломуцинового слоя – морфологического субстрата бокаловидных клеток, покрывающего эпителиальную поверхность слизистой оболочки и реализующего защитный эффект. Учитывали показатели светооптической плотности распределения фермента щелочной фосфатазы исчерченной камерки энтероцитов, эквивалентной процессам, определяющим всасывание и трансмембранный перенос. Динамика ее

активности тесно связана со скоростью миграции, дегенерации и деструкции кишечного эпителия. На парафиновых срезах толщиной 4 мкм с использованием иммуно-энзимного полимерного метода детекции по ядерному антигену (PCNA, clone PC10) были выявлены клетки камбиальной зоны в S-фазе или синтетической, во время которой происходит синтез и репликация ДНК. Именно клетки S-фазы определяют проявление лимфоцитами морфогенетической активности перед подготовкой клеток к делению. Чем значительнее повреждение органа, тем выше стимулирующая активность лимфоцитов в процессах деления клеток, что подчеркивает их участие в процессе регенерации. Они могут не только стимулировать ее, но и подавлять, поддерживая клеточное равновесие. Качественную и количественную характеристику микрообъектов проводили у каждого животного с использованием бинокулярного микроскопа, снабженного цифровой видеофотокамерой ОРТКА и компьютерной программы, адаптированной к исследованиям в данной работе. Объем материала, необходимого для исследования определен методом аккумуляции средних. Полученные данные обрабатывали статистическим методом с помощью стандартного пакета статистических функций "Excel" – 2007, "Statistika" – 8.0 for Windows, "SPSS" 13.0. for Windows с использованием методов вариационной статистики; корреляционного и корреляционного адаптометрического анализа, а также компьютерного моделирования.

### Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали, что в хронодинамике отдаленных сроков наблюдения в слизистой оболочке тощей кишки контрольных крыс были обнаружены возрастные изменения, которые констатировали их зависимость от возраста с достоверными показателями по всем критериям к последнему сроку. Причем, исследуемые критерии разнонаправлено испытывали влияние временно-го параметра.

Результаты описательной статистики топографической динамики ИЭЛ в эксперименте показали зависимость от всех параметров  $\gamma$ -облучения в диапазоне малых доз и определили их функцио-

нальную направленность. После однократного и фракционированного  $\gamma$ -облучения на примере 180 сут спустя только в нижней трети ворсин наблюдалось повышение ИЭЛ в диапазоне малых доз, исключение составила доза 1 Зв, где наблюдалось их снижение. В верхней и средней третях ворсин изменения носили гетерогенный характер. Можно предположить, что топография ИЭЛ определяла их функциональную направленность, которая имела различный характер, определяющий дифференцировку вновь образовавшихся клеток и защиту в зоне десквамирующих энтероцитов.

На основе компьютерного моделирования был показан сплайн-эффект, имеющий разную степень топографической выраженности распределения ИЭЛ от параметров  $\gamma$ -облучения. Кривая графического исполнения интерполяции определила сплайн-функцию и ее деформация была вызвана реакциями на возникшие смещения заданных критериев. В условиях эксперимента сплайн-модель была индивидуальной и аппроксимирована параметрами  $\gamma$ -облучения.

Учитывая ключевую роль лимфоцитов в реализации иммунной регуляции структурной и функциональной целостности организма, в условиях эксперимента была изучена сравнительная динамика показателей индекса миграции лимфоцитов, митотического индекса и количества клеток, находящихся в синтетической фазе. Хронодинамика пострадиационного периода модифицировала дозовый диапазон воздействия  $\gamma$ -излучения. Выявлена закономерность, констатирующая, что при увеличении числа клеток в S-фазе на фоне возрастания индекса миграции лимфоцитов при облучении в дозах: 0.1 Зв спустя 365 и 545 сут; 0.2 Зв – 180 сут; 0.5 Зв – 180 и 545 сут; 1 Зв – 545 митотический индекс снижался, а его достоверное увеличение регистрировалось на фоне снижения численности клеток в S-фазе и индекса миграции лимфоцитов при облучении в дозах: 0.2 Зв через 365 сут, 0.5 и 1 Зв – 730 сут после однократного облучения, определяя регулируемую роль лимфоцитов.

Данные корреляционного анализа исследуемых критериев показали, что по сравнению с контролем отмечалось изменение существующих связей и формирование новых, подтверждающих и констатирующих динамичную взаимосвязи-

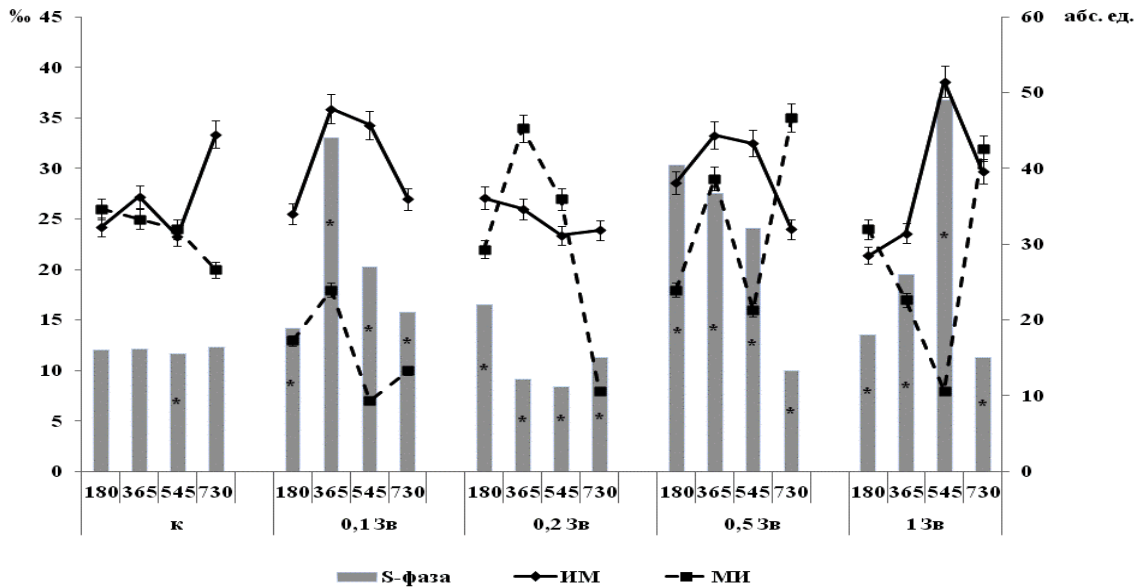


Рис. Хронодинамика индекса миграции лимфоцитов, митотического индекса и клеток, находящихся в синтетическом периоде, в диапазоне экспериментальных доз после однократного  $\gamma$ -облучения. Обозначения: ИМ – индекс миграции лимфоцитов, МИ – митотический индекс.

мость критериев на новом уровне в пострадиационной хронодинамике  $\gamma$ -облучения с широким диапазоном параметров малых доз. Величина корреляционных связей между разными параметрами служила показателем динамики состояний в эксперименте.

Корреляционный адаптометрический анализ показал, что адаптивное состояние по некоторым исследуемым критериям возникало во все периоды наблюдения после однократного гамма-облучения без участия дозы 1 Зв. Например, между индексом миграции и митотическим индексом адаптивный эффект обнаруживался спустя 180 и 365 сут при дозе 0.2 Зв и приближение к показателям контроля было при дозе 0.5 Зв спустя 730 сут.

После фракционированного  $\gamma$ -облучения спустя 365 сут при дозе 0.1 Зв. Спустя 180 суток адаптивное состояние между критериями не возникало.

### Заключение

Реакция кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани по результатам компьютерной гистофотометрии зависела от параметров  $\gamma$ -облучения и пострадиационного периода и проявлялась образованием лимфоцитарного инфильтрата в эпителии и М-клетках, а также лимфоцитарно-плазмочитарного – в субэпители-

альном слое с формированием лимфоидных узелков, констатирующих усиление антителогенеза, информируя о неблагополучии гомеостаза на фоне дезинтеграции состояния барьерных образований по показателям светооптической плотности распределения сиаломуцинов и щелочной фосфатазы энтероцитов. Корреляционный адаптометрический анализ определил адаптивное состояние по некоторым исследуемым критериям во все периоды наблюдения после однократного  $\gamma$ -облучения в избирательном дозовом диапазоне без участия дозы 1 Зв, а после фракционированного – при всех дозах, с исключением отдаленного периода – 180 суток, что не решало судьбу гомеостаза. Выявлена некоторая закономерность, констатирующая, что при повышении числа клеток S-фазы на фоне возрастания индекса миграции лимфоцитов при дозе 0.1 Зв спустя 365 и 545 сут; 0.2 Зв – 180 сут; 0.5 Зв – 180 и 545 сут; 1 Зв – 545 сут ( $p < 0,05$ ) после однократного применения доз; в условиях фракционированного  $\gamma$ -облучения: при дозе 0.1 Зв спустя 365; 545 и 730 сут; 0.2 Зв – 545 и 730 сут; 0.5 и 1 Зв – 545 сут ( $p < 0,05$ ), при этом, независимо от кратности доз митотический индекс снижался, и он повышался ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения числа клеток S-фазы и индекса миграции лимфоцитов при дозе 0,2 Зв через 365 сут, дозе 0.5 и 1 Зв – 730 сут ( $p < 0,05$ ) после однократного облучения, а при фракционировании до-

зы 1 Зв спустя 365 сут с меньшей выраженностью, определяя регулируемую роль лимфоцитов в процессах восстановления с признаками их морфогенетической активности.

#### Список литературы

1. *Воронцова З.А.* Оценка иммунного статуса слизистой оболочки тощей кишки в модельном алгоритме эффектов  $\gamma$ -облучения / З.А. Воронцова, В.В. Зюзина // Аллергология и иммунология. 2011. Т. 12, № 1. С. 59.
2. *Гриневич Ю.А.* Иммунные и цитогенетические эффекты плотно- и редкоионизирующих излучений: монография / Ю.А. Гриневич, Э.А. Демина ; под ред. А.А. Ярилина. Киев: Здоровья, 2006. 200 с.
3. *Котеров А.Н.* Малые дозы и малые мощности доз ионизирующей радиации: регламентация диапазонов, критерии их формирования и реалии XXI века / А.Н. Котеров // Медицинская радиология и

радиационная безопасность. 2009. Т. 54, № 3. С. 5–26.

4. Инфраструктура универсального вычислительного комплекса для количественной оценки скрытого профессионального риска / А.Г. Хрупачев [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. Тула, ТулГУ, 2012. № 1. С. 47–49.

#### Информация об авторах

**Воронцова Зоя Афанасьевна** – докт. биол. наук, профессор, академик МАНЭБ, академик ЕАЕН, заведующая кафедрой гистологии ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, председатель Воронежского отделения Российского научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.

**Шишкина Виктория Викторовна** – канд. мед. наук, ассистент кафедры гистологии ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.

Поступила в редакцию 30.04.2014 г.