

УДК 611.41.018 : 612.014.482

СТЕРЕОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ДИНАМІКИ ПОСТРАДІАЦІЙНИХ ЗМІН ЛІМФОЦИТІВ БІЛОЇ ПУЛЬПИ СЕЛЕЗІНКИ ЮВЕНІЛЬНИХ МИШЕЙ РАДІОЧУТЛИВОЇ ЛІНІЇ BALB/C

Мотуляк А.П.¹, Толоконнікова Н.М.¹, Слущик В.М.², Шеремета Л.М.³

¹Івано-Франківський державний медичний університет, кафедра, гістології, цитології та ембріології, e-mail: andrewmotulyak@rambler.ru

²Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, кафедра біології та екології, e-mail: sluchykl@optima.com.ua

³Івано-Франківський державний медичний університет, кафедра клінічної фармації з курсом фармакології

Проведено стереологічний аналіз динаміки пострадіаційних змін лімфоцитів білої пульпи селезінки ювенільних мишей самців радіочутливої лінії BALB/c після дії загального одноразового гамма-опромінення в ранньому постнатальному періоді онтогенезу. Встановлено, що у селезінці впродовж усього десятиденного періоду експерименту не спостерігається достовірних змін ні площі самих Т-лімфоцитів, ні їх ядер. Морфометричні дані показують, що В-лімфоцити при статистично однотипних з Т-лімфоцитами розмірах істотно відрізняються за розмірами цитоплазми, а після радіаційної експозиції площа В-лімфоцитів, як і їх ядер статистично перевищує аналогічні показники у інтактних тварин. Кількісний аналіз стану мітохондрій обидвох типів лімфоцитів показав, що ці мембранні органели виявляються досить стійкими до радіаційного впливу і практично не сягають достовірних ні кількісних, ні якісних змін.

Ключові слова: селезінка, лімфоцит, мітохондрія, γ -опромінення.

Motulyak A.P., Tolokonnikova N.M., Sluchyk V.M., Sheremeta L.M. Stereologic analysis of dynamics of lymphocytes' postradiation changes of spleen white mash of juvenile mice BALB/c radiosensitive line. The stereological analysis of dynamics of lymphocytes' postradiation changes of spleen white mash of juvenile males' mice BALB/c radiosensitive line was carried out after an action general disposable γ -irradiating in the early postnatal period of ontogenesis. It is set that in a spleen during all of ten days' period of experiment were not observed reliable changes of neither area of T-cell nor it nucleuses. Morphometric information shows that B-lymphocytes statistically the same type with T-cell sizes substantially differ after the sizes of cytoplasm, and after a radiation display area of B-lymphocytes, as well as it nucleuses statistically exceeds analogical indexes for intact animals. The quantitative analysis of the state of mitochondriones of both types of lymphocytes rotined that these membrane organoides appear proof enough to radiation influence and practically does not arrive at reliable neither quantitative nor qualitive changes.

Key words: spleen, lymphocytes, mitochondrion, γ -irradiation.

Вступ

У зв'язку з накопиченням нових фактичних даних стосовно механізмів радіаційно-індукованого апоптозу в останні роки просуюються уявлення про те, що його «класична» форма являє собою лише один із відомих різновидів загибелі клітин [1,6,9]. Дослідження різних форм загибелі клітин потребують нових теоретичних і методичних підходів та моделей. Однією із них, на наше глибоке переконання і може бути експериментально змодельований апоптоз клітин органів імунної системи радіочутливих тварин, який індукується саме малими дозами радіації [3]. Водночас, отримані за останні роки нові дані створюють передумови і визначають головний напрямок дослідження структурних основ механізмів радіаційного пошкодження такої суперчутливої до опромінення клітинної системи, якою є лімфоцити. При відсутності достовірних стереологічних ультраструктурних відомостей щодо механізму апоптозу лімфоцитів в органах імунної системи, що розвиваються в нормі [2,7] та однозначного доказу мембраноушкоджуючої дії малих доз радіації з ініціацією апоптозу [4,5] представляється обґрунтованим і необхідним провести стереологічний аналіз динаміки пострадіаційних змін Т- і В-лімфоцитів на базі строгого кількісного (морфометричного) підходу.

Отож, метою роботи був стереологічний аналіз динаміки пострадіаційних змін лімфоцитів білої пульпи селезінки ювенільних мишей самців радіочутливої лінії BALB/c після дії загального одноразового гамма-опромінення в ранньому постнатальному періоді онтогенезу.

Матеріали і методи

Досліджено селезінку 78 ювенільних мишей-самців радіочутливої лінії BALB/c. Контрольну групу складала 18 тварин. 60 піддослідних тварин у віці 6-7 діб після народження були одноразово опромінені на установці Агат-Р1, заряд ^{60}Co , потужність дози 45,9 Р/хв, поле 20 x 20 см, ВДП - 1м (відстань до шкіри). 30 мишей підлягали зовнішньому, одноразовому, загальному гамма-опроміненню в дозі 0,05 Гр (мала доза) і така ж кількість – в дозі 0,2 Гр (проміжна доза). Утримання, догляд за тваринами і усі маніпуляції проводили у чіткій відповідності до положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей” (Страсбург, 1985). Евтаназію здійснювали шляхом декапітації. Матеріал від тварин експериментальних груп забирали через 1, 2, 3, 5, 7 та 10 діб після опромінення. Окрім цього, селезінку відбирали у 18 тварин контрольної групи з аналогічними інтервалами часу. Для ультрамікроскопічного дослідження одержаний матеріал обробляли згідно загальноновизнаних методів, із наступним залиттям сумішшю епону та аралдиту. Півтонкі зрізи, отримані на ультрамікроскопі Tesla, фарбували толуїдиновим синім. Ультратонкі зрізи контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю, досліджували і фотографували в електронному мікроскопі ПЕМ – 125К. При проведенні морфометричного дослідження керувалися загальними принципами морфо- та стереоморфометрії [3]. На напівавтоматизованому пристрої обробки графічних зображень були одержані стереологічні показники для Т- і В-лімфоцитів білої пульпи селезінки ті їх мітохондрій. З метою отримання стереологічних показників від кожної тварини фотографувалося по 30 випадкових лімфоцитів без ознак апоптозу при збільшенні x 8000. Для отримання кількісних показників мітохондрій фотографування проводили при збільшенні x 20000. При цьому вираховувалися наступні показники: середня площа зрізу профілю клітини і середня площа зрізу профілю ядра; для мітохондрій - об'ємна щільність, кількісна щільність, середня площа зрізу профілю мітохондрій. Біометрична обробка кількісних даних за кожним параметром проводилася з попереднім визначенням необхідного об'єму вибірки. Статистична обробка даних здійснювалася методами варіаційної статистики, засобами StatGraphPad Prism4 (GraphPad Software Inc., USA). По кожному з показників обчислювалися середнє значення та стандартна похибка для кожної з піддослідних тварин. На цій основі одержували об'єднані показники для кожної групи тварин.

Результати та обговорення

Стереологічний аналіз динаміки пострадіаційних змін в селезінці був проведений нами для Т- і В-лімфоцитів окремо. Було встановлено, що у мишей контрольної групи середня площа Т-лімфоцитів складає $(18,12 \pm 2,26) \times 10^{-2} \text{ мкм}^2$ при середній площі зрізу ядра $(13,25 \pm 2,04) \times 10^{-2} \text{ мкм}^2$ (табл.1). У селезінці впродовж усього десятиденного періоду спостереження не спостерігається жодних достовірних змін ні площі самих Т-лімфоцитів, ні їх ядер (табл.1).

Таблиця 1. Динаміка стереологічних показників Т- лімфоцитів селезінки після тотального гамма-опромінення у дозі 0,2 Гр.

	Площа лімфоцита 10^{-2} мкм^2	Площа ядра 10^{-2} мкм^2
Контроль	$18,12 \pm 2,26$	$13,25 \pm 2,04$
6 год	$17,12 \pm 3,41$	$12,05 \pm 2,36$
1 доба	$16,99 \pm 1,98$	$12,31 \pm 1,58$
5 діб	$13,83 \pm 1,38$	$10,55 \pm 1,93$
10 діб	$16,23 \pm 1,18$	$11,99 \pm 1,38$

Щодо В-лімфоцитів, то їх середня площа у контрольній групі складає $(24,65 \pm 3,00) \times 10^{-2} \text{ мкм}^2$, тоді як середня площа ядра $(13,30 \pm 1,95) \times 10^{-2} \text{ мкм}^2$ (табл.2). Морфометричні дані показують, що В-лімфоцити при статистично однотипних з Т-лімфоцитами розмірах істотно відрізняються за розмірами цитоплазми, що зумовлено їх різною функціональною направленістю і великою насиченістю цитоплазми В-лімфоцитів органелами біосинтетичного плану. Через 6 годин після радіаційної експозиції площа В-лімфоцитів, як і їх ядер статистично перевищує аналогічні показники у інтактних тварин і дорівнюють $(34,18 \pm 2,41) \times 10^{-2} \text{ мкм}^2$ і $(21,84 \pm 1,34) \times 10^{-2} \text{ мкм}^2$ відповідно (табл.2). Через 24 години площа В-лімфоцитів набуває подальшого зростання, тоді як показник площі ядра залишається незмінним у порівнянні з попереднім терміном (табл.2). Через 5 діб ці показники статистично достовірно зменшуються у порівнянні з 1 добою і наближаються до контрольних величин, досягаючи їх на 10 добу після радіаційного впливу (табл.2).

Проведений нами стереологічний аналіз пострадіаційної динаміки змін лімфоцитів та їх мітохондрій засвідчив, що ці величини і, в першу чергу розмірні показники, зазнають певних коливань, природа яких, за даними літератури [4,10] відображає зміни проникності плазматичних мембран і мембран органел для трансмембранних потоків. Достовірне зростання площі В-лімфоцитів через 6 годин, 1 і 5 діб після опромінення у дозі 0,2Гр свідчить про переважання у ці періоди трансмембранних переміщень, спрямованих з інтерстиційних просторів у клітину, що і призводить до їх набряку. На 10 добу зменшення клітинних розмірів до рівня контролю може, з одного боку, відображати зміну трансмембранних потоків в напрямку з клітини у міжклітинну речовину, з іншої – загибель збільшених у розмірах та уражених радіацією апоптозних лімфоцитів.

Таблиця 2 . Динаміка стереологічних показників В-лімфоцитів селезінки після тотального гамма-опромінення у дозі 0,2 Гр.

	Площа лімфоцита, 10^{-2} мкм ²	Площа ядра, 10^{-2} мкм ²
Контроль	24,65 ± 3,00	13,30 ± 1,95
6 годин	34,18 ± 2,41*	21,84 ± 1,34*
1 доба	41,02 ± 1,84**	23,86 ± 1,30*
5 діб	30,74 ± 2,67**	18,97 ± 2,47
10 діб	23,02 ± 2,97	13,88 ± 1,40

Примітка: * - достовірно по відношенню до контрольної групи (p<0,05)
** - достовірно по відношенню до попередньої групи (p<0,05)

Кількісний аналіз стану мітохондрій обидвох типів лімфоцитів показав, що ці мембранні органели загального призначення виявляються досить стійкими до радіаційного впливу і практично не сягають достовірних ні кількісних, ні якісних змін (табл.3,4).

Таблиця 3. Динаміка стереологічних показників мітохондрій Т-лімфоцитів селезінки після тотального гамма-опромінення у дозі 0,2 Гр.

	Об'ємна щільність мітохондрій, %	Кількісна щільність мітохондрій, 10^{-2} /мкм ³	Площа мітохондрій, 10^{-2} мкм ²
Контроль	1,67 ± 0,52	9,72 ± 3,08	18,82 ± 2,35
6 годин	1,08 ± 0,78	5,96 ± 4,08	18,88 ± 3,39
1 доба	2,05 ± 0,59	7,34 ± 1,06	23,10 ± 3,50
5 діб	1,48 ± 0,68	6,96 ± 3,08	16,98 ± 4,59
10 діб	0,83 ± 0,65	9,04 ± 6,83	11,79 ± 4,01

Таблиця 4. Динаміка стереологічних показників мітохондрій В-лімфоцитів селезінки після тотального гамма-опромінення у дозі 0,2 Гр.

	Об'ємна щільність мітохондрій, %	Кількісна щільність мітохондрій, 10^{-2} /мкм ³	Площа мітохондрій, 10^{-2} мкм ²
Контроль	4,54 ± 0,74	16,52 ± 2,49	25,91 ± 2,61
6 годин	2,86 ± 0,81	15,31 ± 5,85	22,56 ± 2,50
1 доба	2,49 ± 0,50	16,03 ± 5,08	17,79 ± 1,14
5 доба	2,89 ± 0,47	11,84 ± 2,10	23,12 ± 1,62
10 діб	2,09 ± 0,18	13,17 ± 0,02	18,44 ± 1,42

Виявлені нами морфометричні ознаки стабільності мітохондрій лімфоцитів білої пульпи переконливо свідчать про їх активну участь у регуляції апоптозу лімфоцитів органів імунної системи та дозволяють поряд з іншими авторами [2,3,8] стверджувати, що цей процес не є хаотичним і асинхронним. Аналізуючи пострадіаційну динаміку змін таких стереологічних показників лімфоцитів як площа В-лімфоцита та його ядра, можливо прийти до висновку, що вони відображають складний комплекс адаптаційної перебудови метаболізму, котрий включається як інтегральна реакція клітини на пошкодження ДНК. Логічно припустити, що за умов дії радіації індуюються не тільки гени апоптозу, але і гени «стресорної відповіді». Останні запускають програму репарації уражених лімфоцитів і активують фагоцитарну активність макрофагів, які, за даними літератури [1,5] забезпечують в наступному елімінацію апоптозних лімфоцитів.

Висновки

У результаті проведених досліджень можна констатувати наступне:

1. впродовж усього десятиденного періоду експерименту не спостерігається достовірних змін ні площі самих Т-лімфоцитів, ні їх ядер;
2. В-лімфоцити при статистично однотипних з Т-лімфоцитами розмірах в контролі істотно відрізняються за розмірами цитоплазми, а після радіаційної експозиції площа В-лімфоцитів, як і їх ядер статистично перевищує аналогічні показники у інтактних тварин;
3. кількісний аналіз стану мітохондрій обидвох типів лімфоцитів показав, що ці мембранні органели загального призначення виявляються досить стійкими до радіаційного впливу і практично не сягають достовірних ні кількісних, ні якісних змін.

Література

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 320с.
2. Мотуляк А.П., Случик В.М., Толоконнікова Н.М. Стереометричні зміни лімфоцитів при радіаційно-індукованому апоптозі в тимусі та селезінці мишей лінії BALB/c // «Механізми функціонування фізіологічних систем»: Матеріали міжнародної наукової конференції, Львів. – 2006. – С.103-104.
3. Мотуляк А.П. Ультраструктурні та морфометричні зміни мітохондрій і ядер лімфоцитів при радіаційно-індукованому апоптозі в тимусі ювенільних мишей-самців лінії BALB/c // Вісник морфології. – 2006. – Т.12,№2. – С.213-117.
4. Радиочувствительность и мембраны лимфоцитов. //Под ред. Афониной Г.Б., Яценко В.П. – К.: НМУ им. О.О.Богомольца, 2001. – 203с.
5. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов // Иммунология. – 2004. – Т.25,№5. – С.312-320.
6. Bonner W.M. Low-dose radiation: Thresholds, bystander effects and adaptive responses // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol.100,N9. – P.4973-4975.
7. Dubrova J.E. Radiation-induced transgenerational instability // Oncogene. – 2003. – Vol.22,N45. – P.7087-7093.
8. Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H. Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane // Cell. – 2002. – Vol.11. – P.331-342.
9. Mothersill C., Seymour C. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions // Radiat. Res. – 2001. – Vol.155,N6. – P.759-767.
10. Pouget J.-P., Mather S.J. General aspects of the cellular response to low- and high- LET radiation // Eur. J. Nucl. Med. – 2001. – Vol.28. – P.541-561.

Стаття поступила до редакції 18.03.2008 р.; прийнята до друку 31.03.2008 р.