

О.А. Романова,
Т.А. Сидоренко,
Н.І. Ігумнова

Інститут мікробіології
та імунології
ім. І.І. Мечникова
АМН України, Харків

Вторинний імунodefіцит у щурів, підданих ікс-опроміненню в малих дозах у доімплантаційному періоді ембріогенезу

Secondary immune deficiency in rats exposed
to low-dose x-ray during pre-implantation
period of embryogenesis

Цель работы: Изучение влияния радиационного фактора в раннем эмбриогенезе на состояние иммунитета рожденного потомства.

Материалы и методы: Крысы популяции Wistar были облучены в дозе 0,5 Гр на 3-и сутки беременности. Параллельно сформирована группа интактных необлученных беременных самок.

Состояние иммунной системы потомства обеих (1) облученных в раннем эмбриональном периоде; 2) необлученных) групп животных оценивали на 7-е, 14-е и 30-е постнатальные сутки по следующим показателям: 1) содержание Т- и В-лимфоцитов в селезенке; 2) количество аутореактивных лимфоцитов в селезенке; 3) содержание ЦИК в сыворотке крови; 4) уровень комплемента; 5) фагоцитарная активность (фагоцитарный индекс и фагоцитарное число) лейкоцитов крови; 6) бактерицидная активность лейкоцитов крови (в НСТ-тесте).

Результаты: Исследования показали, что у облученного в раннем периоде эмбриогенеза потомства наблюдается дефицит В-лимфоцитов селезенки на 7-е и 30-е постнатальные сутки и Т-лимфоцитов — на 14-е сутки; снижение функциональной активности фагоцитов крови и активности комплемента на всех этапах исследования; динамический рост содержания аутореактивных лимфоцитов селезенки и уровня ЦИК.

Выводы: Полученные результаты свидетельствуют о наличии у животных, облученных в малых дозах в доимплантационном периоде эмбриогенеза, приобретенного иммунодефицитного состояния с поражением Т-, В-, фагоцитарного звеньев иммунитета, сопровождающегося аутореактивным процессом.

Ключевые слова: вторичный иммунодефицит, облучение, малые дозы, доимплантационный эмбриогенез.

Objective: To study the influence of radiation factor during early embryogenesis on the condition of immunity in the offsprings.

Material and Methods: Wistar rats were exposed irradiated at a dose of 0.5 Gy on the 3rd day of pregnancy. A group of intact pregnant females was formed simultaneously.

The condition of the immune system of posterity in the both (irradiated in early embryonal period and nonirradiated) groups of animals was estimated on the 7th, 14th and 30th postnatal days using the following parameters: 1) T- and B-lymphocyte amount in the spleen; 2) the amount of auto-reactive lymphocytes in the spleen; 3) amount of circulating immune complexes in the serum; 4) complement level; 5) phagocytic activity of blood leukocytes (phagocyte index and phagocyte number), 6) bactericide activity of blood leukocytes (HCT test).

Results: The investigations demonstrated deficiency of B-lymphocytes in the spleen on the 7th and 30th postnatal days and T-lymphocytes on the 14th day; reduction of functional activity of blood phagocytes and complement activity on all investigation phases as well as dynamic growth in the number of spleen auto-rosette-forming lymphocytes and level of circulating immune complexes.

Conclusion: The obtained findings suggest the presence of acquired immune deficiency in animals exposed to low dose radiation during pre-implantation period of embryogenesis, acquired immune deficiency with damage of T-, B- and phagocytic links of immunity accompanied by auto-reactive process.

Key words: secondary immune deficiency, irradiation, low doses, pre-implantation embryogenesis.

Нині відомо, що в ембріональному і фетальному періодах розвитку існують стадії, коли зародкові властива підвищена чутливість до впливу ушкоджуючих факторів середовища. У ці критичні для ембріогенезу часові відрізки спостерігається активація клітинного і тканинного диференціювання і значне посилення процесів обміну. Слід зазначити, що ушкоджуючий вплив факторів зовнішнього середовища на ембріон або плід практично не залежить від специфічності фактора [1].

За даними літератури, кровотворення в ембріогенезі формується протягом перших 7 діб у жовточному мішку, звідки стовбурові кровотворні клітини мігрують до ембріональної печінки [2]. Виходячи з цього, можна припустити, що саме початкові етапи формування ембріонального гемопоезу є найчутливішими до дії зовнішніх ушкоджуючих факторів.

Наші попередні дослідження виявили, що процес післянатального становлення лімфомієлоїдного комплексу щурів, що отримали ікс-опро-

мінення в малих дозах до імплантації ембріонів у стінку матки, характеризується різноспрямованими змінами: підвищенням синтезу клітин еритроїдного ряду, еозинофільних гранулоцитів у мієлоїдному паростку, моноцитарних та плазматичних клітин у кістковому мозку та селезінці, а також лімфоцитів у тимусі поряд з недостатністю утворення нейтрофільних гранулоцитів і В-лімфоцитів у центральному лімфомієлоїдному органі [3, 4].

Проте кількісні параметри післянатального становлення складу елементів крові, структури та клітинного складу лімфомієлоїдних органів не є абсолютно об'єктивними показниками змін функціональної активності лімфомієлоїдного комплексу і, насамперед, лімфоїдних структур, які визначають напруженість і динаміку розвитку імунних реакцій. Зважаючи на те, що порушення у системі імунітету в одних випадках можуть призводити до формування імунодефіцитних станів у опроміненого в ембріогенезі потомства, в інших — слугувати передумовою виникнення різного роду патологічних процесів або суттєво змінювати перебіг вже існуючих захворювань, особливо тих, патогенез яких визначають імунні механізми, метою даного експериментального дослідження було вивчення впливу радіаційного фактора в ранньому ембріогенезі на стан імунітету народженого потомства.

Роботу виконано в межах наукової теми «Морфофункційні зміни кровотворної та імунної систем тварин, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання в доімплантаційному періоді» (№ держреєстрації 0100U000407).

Методика дослідження

Експерименти виконано на новонародженому потомстві щурів популяції Wistar, опроміненому в ранньому ембріогенезі (до імплантації зародка в стінку матки).

Для одержання потомства використовували самиць і самців 8–12-тижневого віку масою 170–190 г, отриманих із віварію Харківського державного медичного університету. Самиць на стадії циклу, що відповідав пізньому проєструсу або ранньому еструсу, підсаджували до самців у співвідношенні 2:1 наприкінці дня. Вагітність констатували наступного дня, досліджуючи піхвовий мазок.

На 3-тю добу вагітності самиць одноразово опромінювали на установці РУМ-17 у дозі 0,5 Гр протягом 3 хвилин 26 секунд при напрузі на трубці 120 кВ, силі струму 10 мА, фільтрі 0,5 мм Си + 1 мм Al. Після опромінювання тварин повертали до віварію і тримали в звичайних умовах. Однотимчасно з дослідною формували контрольну групу інтактних вагітних самиць для отриман-

ня неопроміненого потомства. Всього у дослідній групі було використано 36 самиць, у контрольній — 30. Кількість приплоду від маток опроміненої групи становила 6–9, контрольної групи — 8–11 особин. Утримання та забивання лабораторних тварин відповідало Національним нормам з біоетики [5].

Для дослідження використовували кров і селезінку новонароджених щурів віком 7, 14 і 30 діб.

Тварин морталізували шляхом декапітації під ефірним наркозом. Суспензію спленоцитів отримували в результаті гомогенізації селезінок. Суспензії фільтрували через 4-шаровий капрон, тричі відмивали і ресуспендували у поживному середовищі 199. Підраховували клітини загальновідомим методом у камері Горяєва.

Кількісну оцінку вмісту Т-лімфоцитів і чисельність субпопуляції Т-активних лімфоцитів селезінки визначали в реакції Е-розеткоутворення [6, 7], В-лімфоцитів — в реакції ЕАС-розеткоутворення [8]. Кількість автореактивних лімфоцитів у органі виявляли за допомогою реакції авторозеткоутворення [9].

Вміст низькомолекулярних циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові виявляли, застосовуючи ПЕГ-6000 у концентрації 7 % [10]. Для визначення активності комплементу у периферичній крові використовували гемолітичний фотометричний метод [11].

Фагоцитарну активність лейкоцитів периферичної крові досліджували за відношенням до термічно інактивованого стафілокока (2×10^9 /мл) за показниками фагоцитарного індексу (числа бактерій, фагоцитованих однією клітиною) та фагоцитарного числа (відносної кількості клітин, які здійснюють фагоцитоз).

Кисеньзалежні механізми бактерицидності лейкоцитів крові оцінювали в спектрофотометричному тесті з нітросинім тетразолієм (НСТ-тесті) [12]. Як стимулятор використовували опсонізований зимозан.

При статистичному аналізі результатів використовували параметричні методи. Визначали середнє арифметичне (\bar{X}) та помилку середнього арифметичного ($S\bar{X}$). Вірогідність різниці між показниками різних груп оцінювали за критерієм Стьюдента і вважали значущою при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Було встановлено, що загальна кількість спленоцитів, яка у 7-добових антенатально опроміненних тварин дорівнювала кількості цих клітин у щурів контрольної групи, вже через тиждень перевищувала контрольний рівень, залишаючись превалюючою до останньої, 30-ї доби дослідження. Проте лінійність процесу зростання загальної чисельності спленоцитів не наслідувала жодна з популяцій лімфоїдних клітин селезінки (табл. 1). Так, у новонароджених опроміненних щурят 7-добового віку частка Т-лімфоцитів вірогідно перевищувала відсотковий вміст цих клітин у контрольних тварин. Але у наступний період (14-та доба після народження) відносний вміст Е-розеткоутворюючих клітин швидко знижувався — більше, ніж на 9 % від їх частки у опроміненних тварин на попередньому етапі дослідження. При цьому вміст цієї лімфоїдної популяції у селезінці

навіть вірогідно зменшувався порівняно з контролем ($p < 0,05$). Проте, на 30-ту післянатальну добу знову спостерігалось яскраво виражене збільшення кількості Т-лімфоцитів у антенатально опромінених щурят. Абсолютна кількість пулу Т-клітин у дослідній групі у 6,6 рази перевищувала їх чисельність на попередньому етапі експерименту (14-та доба), тоді як у контрольній групі кількість цих клітин виросла за означений період лише у 4,3 рази. Відсотковий вміст Т-лімфоцитів у групі антенатально опромінених тварин на етапі 30-ї доби після народження на 12,5% перевищував показник інтактних щурят цього ж віку.

Така ж яскрава хвилеподібність процесу післянатального формування простежувалась і у В-лімфоїдній популяції селезінки опромінених тварин, яка немовби була віддзеркаленням становлення Т-популяції. У семидобових тварин частка ЕАС-позитивних клітин була на 13,8% меншою, ніж у контрольній групі — напротивагу питомій вазі Т-клітин в органах опромінених щурят у цей період. Вже через 1 тиждень у особин 14-добового віку відносний вміст В-клітин зростав майже удвічі (перевищуючи контрольний рівень на 9%), а абсолютна кількість — у 3 рази. На 30-ту досліджувану добу відзначався виражений спад відносної кількості В-лімфоцитів, частка яких у цей період на 15% поступалася контрольному рівню. Абсолютна кількість В-клітин за два останні тижні дослідження у опромінених щурів зростає лише в 1,4 рази, тоді як у контрольній групі — триразово.

Можна твердити, що такий хвилеподібний, дзеркально-протилежний характер становлення основних популяцій лімфоїдних клітин на різних післянатальних етапах є найважливішим фактором імунопатологічних змін у організмі антенатально опроміненого потомства, оскільки створює тривале порушення оптимального для кооперації співвідношення клітин Т- і В-популяцій.

Детальний аналіз Т-системи імунітету опромінених тварин виявив також вірогідне збільшення частки Т-активних клітин у тварин 7- та 30-добового віку порівняно з контрольним рівнем. Треба підкреслити, що особливої вираженості підвищення відносного числа Т-активних лімфоцитів набувало у 30-добових щурят — майже вдвічі більше, ніж у тварин контрольної групи.

У антенатально опромінених щурів також вірогідно підвищувалася частка аутореактивних клітин порівняно з такою в інтактних тварин. Особливого вираження цей підйом набував на 14-ту добу післянатального дослідження.

В результаті дослідження такого показника гуморального імунітету, як вміст у сироватці циркулюючих імунних комплексів, було виявлено його зростання на більш пізніх етапах післянатального розвитку опромінених щурят (табл. 2).

Навпаки, рівень комплементу у сироватці антенатально опромінених тварин залишався зниженим ($p < 0,05$) протягом усього періоду дослідження порівняно з цим показником у контрольній групі. Вміст комплементу в 7-до-

Таблиця 1

Вміст популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у селезінці антенатально опромінених щурів, $\bar{X} \pm S\bar{X}$
Amount of lymphocyte populations and subpopulations in the spleen of antenatally exposed rats, $\bar{X} \pm S\bar{X}$

Тварини		Кількість спленоцитів, $\times 10^6$	Е-РУК		ЕАС-РУК		Е-активні РУК		Ауто-РУК		Індекс Е/ЕАС-РУК	Індекс Еа/Е-РУК
вік, дб	група		частка Е-РУК, %	абс. кількість ЕАС-РУК, $\times 10^6$	частка ЕАС-РУК, %	абс. кількість ЕАС-РУК, $\times 10^6$	частка Еа-РУК, %	абс. кількість Еа-РУК, $\times 10^6$	частка ауто-РУК, %	абс. кількість ауто-РУК, $\times 10^6$		
7	К, n=63	31,2 \pm 2,8	21,5 \pm 2,1	6,7 \pm 0,6	39,5 \pm 3,9	12,3 \pm 1,3	13,1 \pm 1,1	4,1 \pm 0,3	5,3 \pm 1,5	1,6 \pm 0,8	0,62 \pm 0,05	0,61 \pm 0,04
	Д, n=99	30,2 \pm 2,4	28,1 \pm 3,0*	8,5 \pm 0,9*	25,7 \pm 2,5	7,8 \pm 0,7*	17,7 \pm 1,6*	5,3 \pm 0,5*	10,8 \pm 2,1*	3,3 \pm 0,6*	1,09 \pm 0,1*	0,62 \pm 0,05
14	К, n=51	39,8 \pm 2,8	22,3 \pm 1,6	8,9 \pm 0,6	41,3 \pm 3,0	16,4 \pm 1,2	12,1 \pm 1,1	4,8 \pm 0,4	5,3 \pm 2,6	2,1 \pm 1,0	0,52 \pm 0,04	0,54 \pm 0,04
	Д, n=87	47,8 \pm 4,3	18,9 \pm 1,2*	9,0 \pm 0,6	50,6 \pm 2,5*	24,2 \pm 1,2*	12,4 \pm 0,9	5,9 \pm 0,5	14,9 \pm 4,7*	7,1 \pm 2,3*	0,37 \pm 0,02*	0,65 \pm 0,05
30	К, n=71	127,2 \pm 10,2	30,5 \pm 1,8	38,8 \pm 2,4	40,5 \pm 1,6	51,5 \pm 2,0	16,2 \pm 1,2	20,6 \pm 1,5	8,6 \pm 1,0	10,9 \pm 1,2	0,75 \pm 0,05	0,53 \pm 0,04
	Д, n=95	140,1 \pm 12,6	43,0 \pm 1,8*	60,2 \pm 2,6*	25,0 \pm 2,0*	35,0 \pm 2,9*	31,5 \pm 1,8*	44,1 \pm 2,6*	20,4 \pm 3,2*	28,6 \pm 4,7*	1,72 \pm 0,1*	0,73 \pm 0,06*

Примітки: 1. Д — тварини дослідної групи; К — тварини контрольної групи. 2. * — вірогідність відмінностей показників дослідних тварин порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Показники неспецифічної реактивності антенатально опромінених щурів, $\bar{X} \pm S\bar{x}$
 Indices of nonspecific reactivity of antenatally exposed rats, $\bar{X} \pm S\bar{x}$

Показник	Група тварин	Вік тварин, діб		
		7	14	30
ЦІК, умов. од.	К	0,030 ± 0,001	0,041 ± 0,002	0,045 ± 0,002
	Д	0,028 ± 0,001	0,050 ± 0,003*	0,058 ± 0,003*
Комплемент, умов. од.	К	0,14 ± 0,007	0,37 ± 0,02	1,25 ± 0,07
	Д	0,11 ± 0,006*	0,25 ± 0,01*	0,95 ± 0,05*
Фагоцитарне число лейкоцитів, %	К	30,1 ± 1,7	31,3 ± 1,7	64,0 ± 3,4
	Д	24,0 ± 1,4*	22,6 ± 1,2*	47,3 ± 2,1*
Фагоцитарний індекс лейкоцитів	К	4,9 ± 0,3	5,5 ± 0,3	7,2 ± 0,4
	Д	3,5 ± 0,2*	4,0 ± 0,2*	5,6 ± 0,3*
НСТ спонт. лейкоцитів, од. екстинкції	К	0,023 ± 0,0016	0,027 ± 0,0016	0,033 ± 0,0017
	Д	0,017 ± 0,0012*	0,020 ± 0,0012*	0,025 ± 0,0014*
НСТ інд. лейкоцитів, од. екстинкції	К	0,035 ± 0,0018	0,046 ± 0,0024	0,051 ± 0,0026
	Д	0,024 ± 0,0015*	0,030 ± 0,0016*	0,036 ± 0,0024*
Індекс стимуляції лейкоцитів	К	1,52 ± 0,08	1,70 ± 0,09	1,54 ± 0,08
	Д	1,41 ± 0,08	1,50 ± 0,08	1,44 ± 0,08

Примітки: 1. * — вірогідність показників порівняно з контролем, $p < 0,05$; 2. Кількість тварин становила на 7-му добу: Д — $n = 99$, К — $n = 63$; на 14-ту добу: Д — $n = 87$, К — $n = 51$; на 30-ту добу: Д — $n = 95$, К — $n = 71$.

бових дослідних щурів становив 77,5 %, у 14-добових — 67,5 %, а у 30-добових — 76 % від його нормального рівня. Знижений вміст комплементу, очевидно, передумовлює спад функціональної активності лейкоцитів антенатально опромінених тварин (див. табл. 2). Іншим проявом цього спаду, як свідчать наші дослідження, є зниження фагоцитарного числа та поглинальної спроможності лейкоцитів периферичної крові опромінених щурят будь-якого віку.

Пригнічення фагоцитарної активності у дослідних щурів супроводжувалося зниженням активації кисеньзалежних механізмів бактерицидної дії фагоцитуючих клітин. Вірогідно зменшені показники спонтанного НСТ-тесту на всіх досліджених етапах післянатального життя опромінених тварин відображують зниження ступеня функціонального подразнення фагоцитів *in vivo*. Недостатність потенціальної активності фагоцитуючих клітин демонструють показники індукованого НСТ-тесту дослідних тварин, вірогідне зниження яких порівняно з контролем спостерігалось на всіх вивчених етапах їх післянатального розвитку.

Очевидно, пригніченість активності фагоцитуючої системи антенатально опромінених новонароджених тварин є причиною, що зумовлює зростання концентрації циркулюючих імунних комплексів, які не можуть достатньою мірою еліминуватися фагоцитарними клітинами.

Виявлене нами підвищення відсоткового вмісту автореактивних клітин у селезінці може бути наслідком перебігу кількох процесів у організмі. Відомо, що у здорового організму імунологічна толерантність до власних тканин підтримується за рахунок двох основних механізмів — специфічного виснаження автореактивних клітин [13] та активної супресії «заборонених» клітинних клонів [14]. Вірогідною причиною автореактивних змін у дослідних тварин може бути порушення толерантності у Т-клітинній ланці.

Збільшенню відсотка автореактивних клітин може сприяти активна клітинна проліферація у тимусі опромінених щурів. При гіперпластичних процесах органа, що спостерігаються у антенатально опромінених тварин [3], частина автореактивних лімфоцитів тимуса може висли-

Література

1. Деміна Д.В., Орловская И.А., Матросова В.Ю., Колесникова О.П. и др. // *Иммунол.* — 2004. — № 4. — С. 201–204.
2. Аршавский И.А. *Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития.* — М., 1982.
3. Коляда Т.И., Романова Е.А., Сидоренко Т.И. и др. // *Таврич. мед.-биол. вестн.* — 2004. — Т.7, № 1. — С. 118–122.
4. Романова О.А., Сидоренко Т.А., Изумнова Н.И., Гогадзе Л.Г. // *Вісн. ХНУ ім. В.Н. Каразіна.* — 2005. — № 705, вип.11. — С. 93–97.
5. *Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики (Київ), 2001 р.* // *Ендокринол.* — 2003. — Т. 8, № 1. — С. 142–145.
6. Jondal M., Holm G., Windgrell H. // *J. Exp. Med.* — 1972. — Vol.136, № 2. — P. 207–215.
7. Felsburg P.J., Edelman R., Gilman R.H. // *The J. of Immunol.* — 1976. — Vol. 116, № 4. — P. 110–113.
8. Limdsten T., Andersson B. // *Cell. Immunol.* — 1981. — Vol. 61, №2. — P. 386–396.
9. Cashon H.J. // *Ibid.* — Vol. 60, № 1. — P. 1–10.
10. Осипов С.Г., Еремеев В.В., Руднев В.И. // *Лаб. дело.* — 1983. — № 11. — С. 3–8.
11. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е. *Определение уровня комплемента фотометрическим методом по 50 %-ному гемолизу* // *Иммунология: Практикум.* — К.: Вища школа, 1989. — С. 288–293.
12. Гордиенко С.М. // *Лаб. дело.* — 1983. — № 2. — С. 21–24.
13. Moroski S. // *Transplantat.* — 1985. — Vol.40, № 2. — P. 201–210.
14. Hooper D.C., Young F.L., Elson C.F., Taylor R.B. // *Cell. Immunol.* — 1987. — Vol. 106, № 1. — P. 53–61.

Надходження до редакції 19.12.2006.

Прийнято 21.03.2007.

Адреса для листування:

Романова Олена Анатоліївна,
пр-т Л. Свободи, 36а, кв.63, Харків, 61240, Україна

зати з-під селекційного контролю та уникати елімінації, виходячи потім у кровотік.

Таким чином, спираючись на наявні дані, можна твердити, що низькодозове опромінення ембріона в ранньому доімплантаційному періоді призводить до формування у народжених особин вторинного імунодефіцитного стану з ураженням Т-, В- та фагоцитарної ланок імунітету і наявністю автореактивного процесу.

ВИСНОВКИ

1. Особливістю імунної системи народженого потомства, опроміненого в малих дозах у доімплантаційному періоді ембріогенезу, є дисбаланс чисельності лімфоцитів основних популяцій, зумовлений дефіцитом В-клітин на 7-му і 30-ту післянатальну добу і Т-лімфоцитів — на 14-ту добу.

2. Досліджені показники неспецифічної резистентності антенатально опроміненого потомства (фагоцитарна та бактерицидна активність лейкоцитів крові, активність комплементу у сироватці крові) зазнають вираженого пригнічення на всіх етапах післянатального розвитку.

3. Визрівання імунної системи особин, опромінених у ранньому ембріогенезі, супроводжується посиленням автореактивного процесу, про що свідчить зростання вмісту авторозеткоутворюючих лімфоцитів у селезінці і концентрації ЦІК у сироватці крові 14- та 30-добових тварин.

4. Отримані результати вказують на наявність у народженого потомства розвитку імунодефіцитного стану, індукованого впливом радіаційного фактора на ембріональний гемопоез на початковому етапі його формування.

Перспективність подальших досліджень імунного гомеостазу потомства, підданого низькодозовому опроміненню у доімплантаційному періоді ембріогенезу, полягає, на наш погляд, у розробці ефективних шляхів корекції вторинного імунодефіцитного стану, характерного для опромінених новонароджених.