

**БИОИНФОРМАЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА В АЛГОРИТМЕ
МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА ТОЩЕЙ КИШКИ**

В.В. ШИШКИНА, З.А. ВОРОНЦОВА

*ГБОУ ВПО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, кафедра гистологии,
ул. Студенческая, 10, Воронеж, 394036, Россия, тел. +7(473)253-02-93*

Аннотация. Проблема изучения воздействия факторов радиационной природы на организм остается актуальной до настоящего времени, несмотря на многолетние исследования. Специфическая профессиональная деятельность с применением радиоактивных материалов и обусловленная экстремальными радиационными ситуациями требует эффективного экспериментального подхода с этиогенным анализом связи выявленных нарушений. В отношении патологического действия факторов ионизирующей радиации на биологические объекты в диапазоне малых доз нет единства взглядов, поэтому возникает необходимость использования интегративного подхода в исследованиях. Эффект лучевого воздействия на организм зависит от поглощенной дозы, ее фракционирования во времени, от пространственного распространения энергии. При этом происходит повреждение или разрушение клеточных, тканевых структур на организменном уровне. Однако, эти закономерности не всегда аргументированы, что усложняет интерпретацию радиобиологических эффектов в сравнительном аспекте, при этом, с достоверностью доказано, что структурные и ультраструктурные особенности изменений соответствуют характеру и степени определенных функциональных и биохимических процессов. В облученном организме выявляется комплекс динамически изменяющихся во времени показателей в зависимости от мощности дозы и пострадиационного периода наблюдения. В работе исследован иммунный статус тощей кишки после воздействия общего однократного и фракционированного ионизирующего облучения с широким диапазоном параметров малых доз и отдаленных сроков наблюдения. Представлена математическая модель сплайн – функции на основе компьютерного моделирования по топографическим показателям распределения интраэпителиальных лимфоцитов. На основе сравнительного анализа выявлена закономерность в реакциях клеток синтетической фазы и митотических клеток камбиальной зоны с индексом миграции лимфоцитов. Обнаруженная «доза-эффект», представленная в модели и построенная на основе пробит-анализа, позволит определить перспективы для разработки профилактических радиозащитных мероприятий от воздействия малых доз γ -излучения.

Ключевые слова: алгоритм, тощая кишка, иммунный статус, γ -излучения.

**BIOINFORMATIC CHARACTERISTICS IN ALGORITHM OF MORPHOLOGICAL STUDIES
OF IMMUNE STATUS JEJUNUM**

V.V. SHISHKINA, Z.A. VORONTSOVA

*Voronezh State N.N. Burdenko Medical University, Studencheskayay str., 10, Voronezh, 394036, Russia,
tel.:+7 (473)253-02-93*

Abstract. The problem of studying the radiation effects on the organism of nature factors remain relevant, despite many years of research. Specific professional activities with the use of radioactive materials and radiation caused by extreme situations require effective experimental approach to the analysis of the communications etiogenic violations. In respect of the pathological effects of ionizing radiation factors on biological objects in low doses there is no unity of views, so there is a need for an integrative approach in research. The effect of radiation exposure on the body depends on the absorbed dose, its fractionation in time, the spatial energy distribution. This results in damage to or destruction of cell, tissue structures at the organismal level. However, these laws are not always reasoned that complicates the interpretation of radiobiological effects in a comparative perspective, at the same time reliably proved that the structural and ultrastructural features correspond to changes in the nature and extent of certain functional and biochemical processes. In the irradiated organism reveals a complex dynamic time-varying rates, depending on the dose rates and post-radiation period. The paper studied the immune status of the jejunum after exposure to a common single and fractionated ionizing radiation with a wide range of parameters of low-dose and long-term follow. A mathematical model of the spline - function on the basis of computer modeling parameters for topographical distribution of intraepithelial lymphocytes is presented. On the basis of the comparative analysis it was revealed a pattern in the reactions of the synthetic phase cells and mitotic cells cambial zone with an index of lymphocyte migration. The found a «dose-response» presented

in the model and built on the basis of the probit analysis, will determine the prospects for the development of preventive measures on the radioprotective effects of low doses of gamma-radiation.

Key words: algorithm, the jejunum, the immune status.

Введение. Весьма актуальным в настоящее время представляется направление по изучению компонентов иммунной системы, участвующих на всех этапах развития организма до старости 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 кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань. 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. Хотя имеются серьезные достижения по обеспечению радиационной безопасности, сохраняется потенциальная возможность облучения большой когорты населения при случайных радиационных инцидентах или преднамеренной враждебной инициации таких ситуаций, определяющих профессиональное вмешательство при ликвидации последствий. 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. Лимфоидные клетки являются оперативной подсистемой, обеспечивающей возможности изменчивости ткани и адаптации к условиям окружающей среды [1, 2]. Неспецифические закономерности реакций иммунного аппарата при длительных пострадиационных нарушениях вместе с математической обработкой позволят выявить дефекты, которые могут быть условной основой для клинической интерпретации иммунопатогенеза, установления диагноза и прогноза. Динамичность модифицирующих эффектов отдаленных последствий воздействия ионизирующей радиации диапазона малых доз γ -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 γ -облучения малыми дозами для выявления защитных механизмов барьерными образованиями слизистой оболочки тощей кишки как наиболее функционального отдела тонкой. Процессы восстановления и закономерности их проявления являются исключительно важными на уровне иммунных реакций и будут способствовать развитию новых подходов в клеточной терапии [3-5].

Цель исследования – оценить лимфоидный компонент слизистой оболочки тощей кишки после воздействия общего однократного и фракционированного ионизирующего облучения с широким диапазоном параметров малых доз и отдаленных сроков наблюдения.

Материалы и методы исследования. Эксперимент был проведен на белых беспородных половозрелых крысах-самцах с начальным возрастом 4 месяца. Экспериментальные крысы испытывали общее равномерное однократное и фракционированное (пятикратное) γ -облучение со спектром 1,2 МэВ на установке «Хизотрон» (60Co). 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, эквивалентная экспозиционной, измеряемая в *зивертах* (Зв), при низких дозах облучения в отдаленные сроки.

В соответствии с планом эксперимента было сформировано 53 группы, в том числе возрастной контроль. Всего 477 крыс. Материалом для исследования являлись 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% нейтральном формалине, с последующей стандартной гистологической проводкой и заливкой в гомогенизированную парафиновую среду. Формировали и маркировали парафиновые блоки, а затем изготавливали микротомные срезы толщиной 6 мкм. Для обзорных целей слизистой оболочки препараты окрашивали гематоксилином и основным коричневым, позволяющим описать рельеф, охарактеризовать эпителий и стromу субэпителиального слоя с сосудистым компонентом и тучными клетками.

На стандартных срединных парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином подсчитывали количество *интраэпителиальных лимфоцитов* (ИЛ) на 20-ти продольно срезанных ворсинках, т.е. подсчеты производились на площади, ограниченной одинаковым числом эпителиальных клеток ($\times 900$). Учитывая гетерогенность ИЛ определяли их количественное распределение соответственно топографическим особенностям в нижней, средней и верхней трети ворсин для характеристики и оценки процесса миграции. Визуально рассматривали лимфоцитарно-плазмочитарный инфильтрат субэпителиального

слоя при окраске толуидиновым синим и по Романовскому-Гимза для характеристики иммунного ответа. При окраске альциановым синим по Сиддмену (1950) с использованием программы *ImageJ*, определяли светооптическую плотность сиаломуцинового слоя – морфологического субстрата бокаловидных клеток, покрывающего эпителиальную поверхность слизистой оболочки и реализующего защитный эффект. Учитывали показатели светооптической плотности распределения фермента щелочная фосфатаза исчерченной каемки 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, clonePC10*) 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, т.е. созидательной функции, перед подготовкой клеток к делению. Чем выше повреждение органа, тем выше стимулирующая активность лимфоцитов в процессах деления клеток, что свидетельствует об их способности передавать регенерационную информацию. Они могут не только стимулировать ее, но и подавлять, поддерживая клеточное равновесие. Качественную и количественную характеристику микрообъектов проводили от каждого животного с использованием бинокулярного микроскопа, снабженного цифровой видеофотокамерой *ОПТИКА* и компьютерной программы, адаптированной к исследованиям в данной работе. Объем материала, необходимого для исследования определен методом аккумулированных 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 [6].

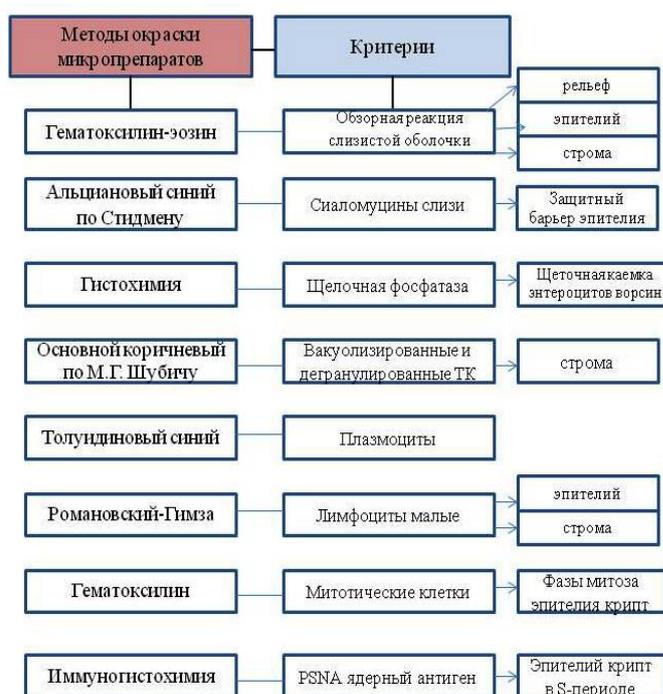


Рис. 1. Алгоритм подготовки материала для информационного анализа морфологических эквивалентов функции

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования показали, что в хронодинамике отдаленных сроков наблюдения в слизистой оболочке тощей кишки контрольных крыс были обнаружены изменения. Мигрировавшие в эпителиальный пласт лимфоциты были обнаружены на всем его протяжении от донных отделов крипт до верхушки ворсинок, однако в криптах они были единичны и изменения с возрастом не имели прямой зависимости. *Интраэпителиальные лимфоциты (ИЛ)*, мигрировавшие в эпителиальный пласт, распределялись неоднородно и в средней трети ворсин их значения были выше. ИЛ занимали преимущественно базальное положение (рис. 2) .

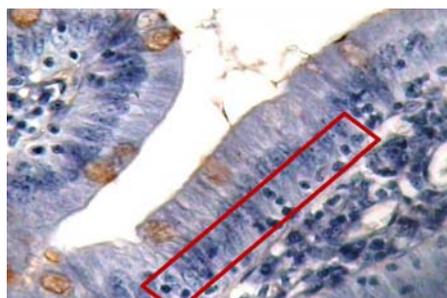
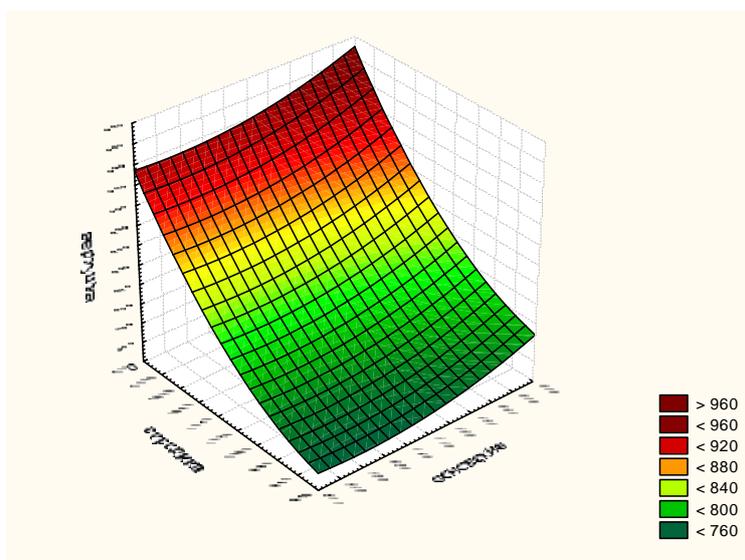
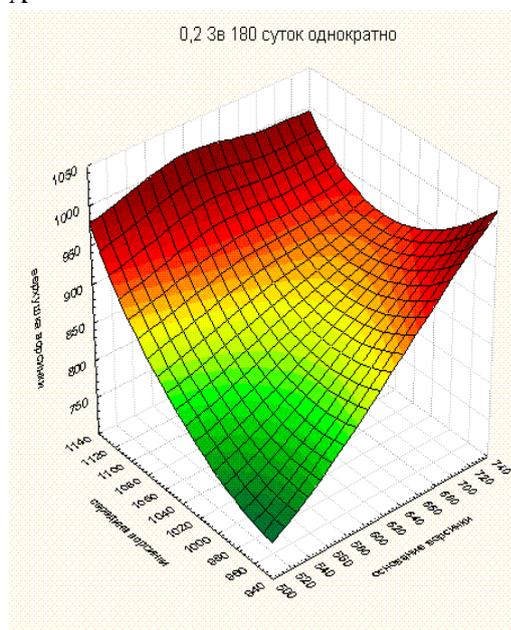


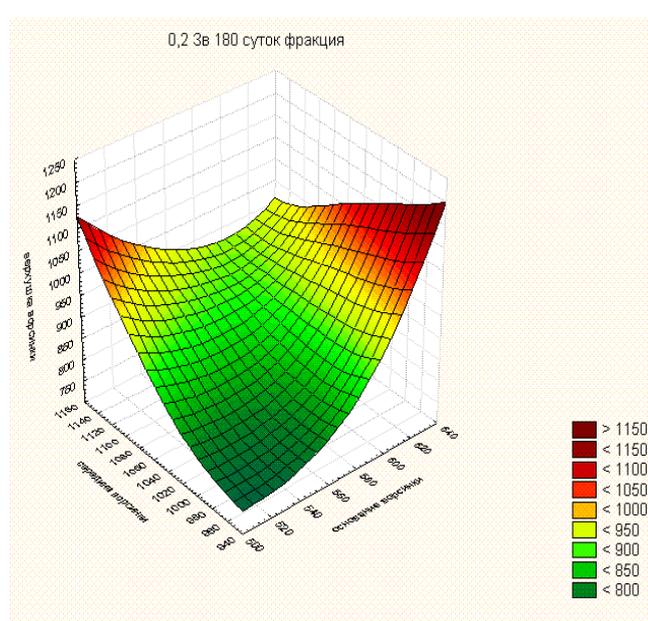
Рис. 2. Окраска гематоксилином эозином. Базальное положение ИЛ в средней трети ворсины



А



Б



В

Рис. 3. Сплайн – модель топографии ИЛ (180 сут) А – контроль; Б – 0,2 Зв однократное γ -облучение; В – 0,2 Зв фракционированное γ -облучение

В настоящей работе рассмотрен вопрос о миграционной активности малых лимфоцитов в эпителиальный пласт тощей кишки в зависимости от условий эксперимента по их количественной оценке.

Количественные показатели динамично изменялись в хронодинамике эксперимента, причем наблюдалась зависимость их пенетрации от топографических особенностей, по которым можно предположить необходимость их участия в защитных реакциях – если это верхушка ворсинки и созидательной функции – если основание. Средняя часть ворсинки является наиболее стабильной в отличие от верхней, где как правило, десквамирующие энтероциты. После однократного и фракционированного γ -облучения спустя 180 суток только в нижней трети ворсин наблюдалось повышение ИЛ, исключение составила доза 1 Зв, где наблюдалось снижение (морфогенетическая активность). В оставшейся части эпителиального пласта наблюдалась гетерогенность распределения и зависела от радиочувствительности. На основе компьютерного моделирования, сеточным методом был показан сплайн-эффект, имеющий разную степень топографической выраженности распределения ИЛ от параметров γ -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 γ -облучения.

Представленная математическая модель сплайн-функции на основе компьютерного моделирования по топографическим показателям распределения интраэпителиальных лимфоцитов, имеет различную графическую деформацию, констатирующую индивидуальный характер интерполяции и аппроксимированную параметрами γ -облучения в эксперименте (рис. 3).

Оценку зависимости «доза-эффект», которая несет в себе информацию об индивидуальной чувствительности исследуемых морфоэнзиматических эквивалентов функции проводили на основании диагностической значимости исследуемых критериев в условиях однократного и фракционированного γ -облучения. Диагностическую значимость критерия выявляли по величине коэффициента детерминации на основе дисперсионного анализа. Максимальные показатели коэффициента детерминации определили наибольшую радиочувствительность, а минимальные относительную радиорезистентность исследуемых критериев (рис. 4, 5).

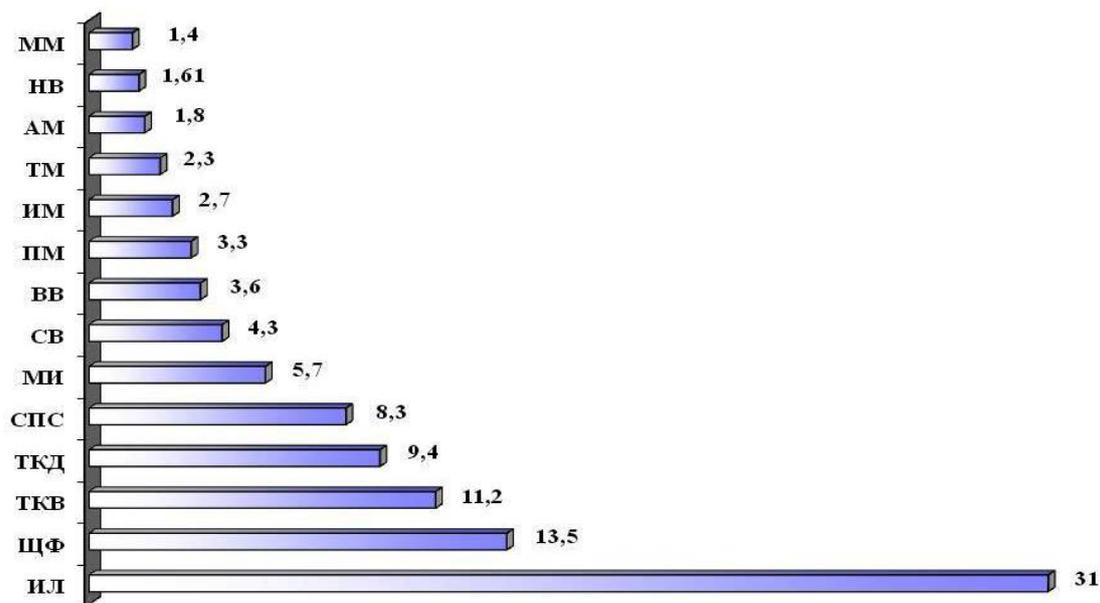


Рис. 4. Диаграмма радиочувствительности критериев по коэффициенту детерминации после однократного γ -облучения

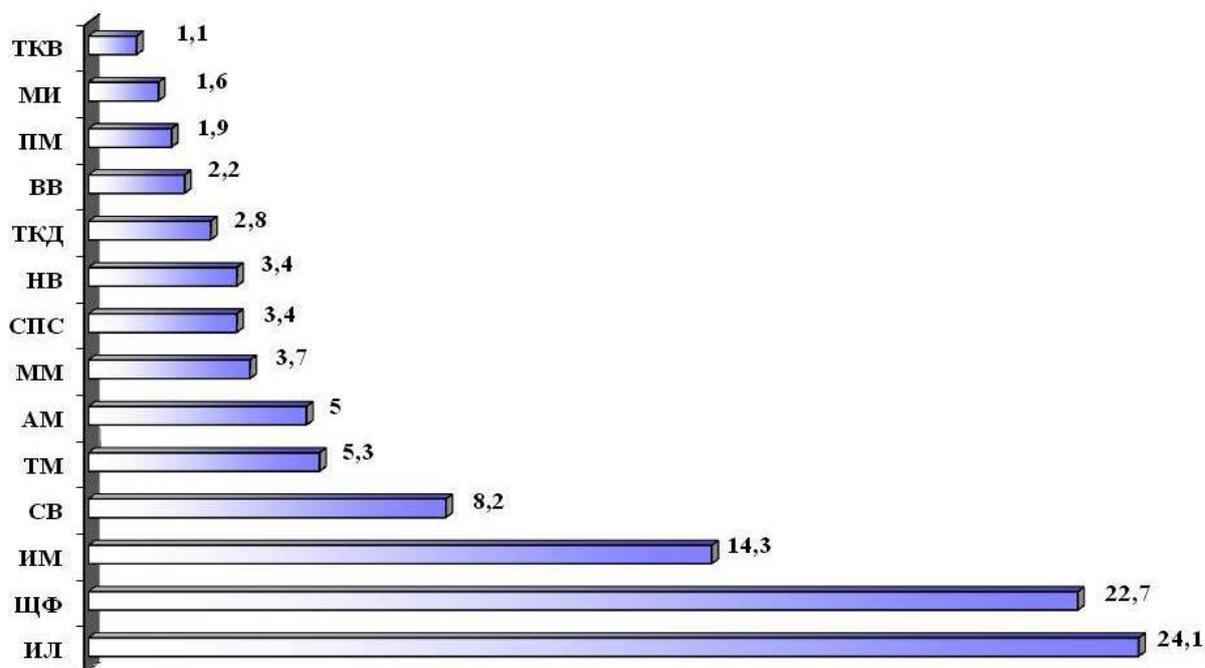


Рис. 5. Диаграмма радиочувствительности критериев по коэффициенту детерминации после фракционированного γ -облучения

Таким образом, результаты по выявлению диагностической значимости исследуемых критериев в условиях отдаленных последствий γ -облучения в широком диапазоне параметров малых доз, кратности их применения и хронодинамике эксперимента на основе дисперсионного анализа показали вариабельность проявления радиочувствительности и была выявлена гиперчувствительность интраэпителиальных лимфоцитов, мигрирующих в эпителиальный пласт. Пробит анализ показал, что эффективная доза однократно γ -облучения, при которой эффект должен отмечаться у 50% (*Prob.* 0,5) животных, в данном случае достоверное изменение количества интраэпителиальных лимфоцитов, должна быть 0,17 Зв, причём с 95%-ой вероятностью эта доза колеблется от 0,14 до 0,21 Зв. Пробит анализ показал, что эффективная доза фракционированного γ -облучения, при которой эффект должен отмечаться у 50% (*Prob.* 0,5) животных, в данном случае достоверное изменение количества интраэпителиальных лимфоцитов, должна быть 0,58 Зв, причём с 95%-ой вероятностью эта доза колеблется от 0,53 до 0,61 Зв.

Выводы: Выявленная на основе сравнительного анализа закономерность в реакциях клеток синтетической фазы и митотических клеток камбиальной зоны с индексом миграции лимфоцитов определяет регулируемую роль лимфоцитов в процессах восстановления.

Показана степень возможного поражающего эффекта, зависящего от параметров γ -облучения и топографии распределения интраэпителиальных лимфоцитов, проявляющих защитные и созидательные функциональные особенности во все отдаленные периоды наблюдения.

Литература

1. Бабаева А.Г. Еще раз о морфогенетической, или строительной функции // Вестник РАЕН. 2010. № 4. С. 70–74.
2. Воронцова З.А., Шишкина В.В. Динамика клеточных популяций слизистой оболочки тощей кишки при воздействии малых доз γ -облучения в эксперименте // Морфология. 2012. Т. 141, вып. 3. С. 63.
3. Радиопротекторы комбинированных и сочетанных воздействий гетероморфных тканей / Воронцова З.А. [и др.] // Журнал анатомии и гистопатологии. 2014. Т. 3, № 3. С. 28–32.
4. Слюсарева О.А. Морфофункциональная характеристика слизистой оболочки тощей кишки после воздействия γ -облучения в малых дозах: дис. к. м. н. Воронеж, 2011.
5. Шишкина В.В., Воронцова З.А. Модифицирующие эффекты отдаленных последствий γ -облучения в диапазоне малых доз // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т. 19, № 2. С. 308–309.
6. Хромушин В.А., Хадарцев А.А., Бучель В.Ф., Хромушин О.В. Алгоритмы и анализ медицинских данных: учебное пособие. Тула: Тульский полиграфист, 2010. 123 с.

References

1. Babaeva AG. Eshche raz o morfogeneticheskoy, ili stroitel'noy funktsii [Once again on the morphogenetic or construction functions]. Vestnik RAEN. 2010;4:70-4. Russian.
2. Vorontsova ZA, Shishkina VV. Dinamika kletochnykh populyatsiy slizistoy obolochki toshchey kishki pri vozdeystvii malykh doz γ -oblucheniya v eksperimente. Morfologiya [The dynamics of cell populations jejunal mucosa upon exposure to low doses of γ -irradiation in the experiment]. 2012;141(3):63. Russian.
3. Vorontsova ZA, et al. Radioprotektory kombinirovannykh i sochetannykh vozdeystviy geteromorfnykh tkaney [Radioprotectors combined and combined effects heteromorphic fabrics]. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2014;3(3):28-32. Russian.
4. Slyusareva OA. Morfofunktsional'naya kharakteristika slizistoy obolochki toshchey kishki posle vozdeystviya γ -oblucheniya v malykh dozakh [Morphofunctional characteristics of the mucous membrane of the jejunum after exposure to γ -irradiation in small doses] [dissertation]. Voronezh (Voronezh region); 2011. Russian.
5. Shishkina VV, Vorontsova ZA. Modifitsiruyushchie efekty ot dalennykh posledstviy g-oblucheniya v diapazone malykh doz [Modifying effects remote consequences of p-radiation in the range of low doses]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2012;19(2):308-9. Russian.
6. Khromushin VA, Khadartsev AA, Buchel' VF, Khromushin OV. Algoritmy i analiz meditsinskikh dannykh: uchebnoe posobie [Algorithms and analysis of medical data: a training manual]. Tula: Tul'skiy poligrafist; 2010. Russian.

Библиографическая ссылка:

Шишкина В.В., Воронцова З.А. Биоинформационная характеристика в алгоритме морфологического исследования иммунного статуса тощей кишки // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2016. №4. Публикация 2-4. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2016-4/2-4.pdf> (дата обращения: 12.10.2016). DOI: 10.12737/22221.