

УДК 616.411

**ДИСКРЕТНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПОСТНАТАЛЬНОГО ГИСТОГЕНЕЗА СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ
РАЗВИТИИ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ НИЗКОДОЗОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

УНИВЕРСАЛЬНОГО ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

Гагулаева Б.Б., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В.

НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ

«Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»,

г. Москва, Россия

Резюме: Изучены процессы морфогенеза селезенки у новорожденных и 7-ми дневных самцов крыс Вистар, подвергавшихся в пренатальном и постнатальном развитии воздействию низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ). Выявлено ускоренное формирование белой пульпы, высокая пролиферативная активность клеток и меньшее содержание В-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой животных. Таким образом, низкодозовое воздействие ДДТ приводит к нарушению координации морфогенетических процессов в селезенке, разобщая процессы дифференцировки, пролиферации и миграции.

Ключевые слова: селезенка; морфогенез; эндокринный дисраптор; ДДТ

**DISCRETENESS OF THE PROCESSES OF POSTNATAL HISTOGENESIS OF THE SPLEEN
DURING THE DEVELOPMENT OF THE ORGANISM UNDER CONDITIONS OF LOW-DOSE
EXPOSURE TO THE UNIVERSAL ENDOCRINE DISRUPTOR DDT**

Gagulaeva B.B., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Yaglov V.V.

Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Center of Surgery,

Moscow, Russia

Abstract: The processes of spleen morphogenesis were studied in newborn and 7-day-old male Wistar rats exposed to low doses of the endocrine disruptor dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) during prenatal and postnatal development. Accelerated formation of white pulp, high proliferative activity of cells and lower content of B-lymphocytes were revealed compared to the control group of animals. Thus, low-dose exposure to DDT leads to disruption of coordination of morphogenetic processes in the spleen, separating the processes of differentiation, proliferation and migration.

Key words: spleen; morphogenesis; endocrine disruptor; DDT

Введение. Известно, что факторы окружающей среды, оказывающие влияние на организм женщины во время беременности, имеют влияние на развитие и рост плода, его органов и систем [8, 13]. Развивающаяся иммунная система является высокочувствительной к экзогенным воздействиям [6]. Одними из таких экзогенных соединений, способных влиять на регуляцию и деятельность иммунной и эндокринной систем, являются эндокринные дисрапторы [6, 7]. К числу самых распространенных эндокринных дисрапторов относится дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). ДДТ – высокоэффективный инсектицид, активно использовавшийся в 1940-х -1970-х годах, в том числе для борьбы с малярией. В связи с возобновлением его использования ДДТ до сих пор широко распространен в развивающихся странах [9, 11, 12]. Он способен проникать через фетоплацентарный барьер, накапливаться в грудном молоке и жировой ткани [5]. Было доказано дисрапторное воздействие низких доз ДДТ на эндокринные железы, органы иммунной защиты [1, 4, 10, 14-16]. Но влияние ДДТ на развитие органов иммунной системы и особенности морфогенетических процессов в них, до сих пор до конца не изучено.

Цель исследования: выявление отличий морфогенетических процессов в селезенке крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в малых дозах, соответствующих уровню воздействия фоновых доз ДДТ на человека.

Материалы и методы. Эксперимент был выполнен на новорожденных (n=28) и 7-дневных (n=30) самцах крыс Вистар. Беременные самки опытной группы получали раствор *o,p*-ДДТ с концентрацией 20 мкг/л вместо питьевой воды в течение всего периода беременности и грудного вскармливания. Группа контрольных животных получала питьевую воду. Отсутствие ДДТ и его метаболитов в питьевой воде и корме контрольных животных было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Животные обеих групп были выведены из эксперимента передозировкой хлороформного наркоза. Определяли массу тела животных и массу селезенки с помощью аналитических весов («Сартогосм», Россия), а также рассчитывали относительную массу органа. После фиксации селезенки в жидкости Буэна, проводили стандартную проводку и изготавливали срезы, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов проводили с помощью световой микроскопии с использованием микроскопа “Leica DM2500”. Также использовали программу ImageScope (Leica Microsystems, Германия) для компьютерной морфометрии.

Вместе с этим, была получена первичная культура спленоцитов для проведения цитофлуориметрии. Клетки выделяли путем гомогенизации селезенки в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) с продавливанием через сетки с отверстиями 40 мкм для отделения от стромы. Клеточную взвесь дважды центрифугировали и отмывали в той же среде в течение 5 минут при 1000 об/мин. Доводили до концентрации 10 млн клеток в 1 мл. Цитофлуориметрическое исследование спленоцитов с использованием антител к CD3, CD45R, конъюгированных с флуорохромами

(«eBioscience», США) для определения содержания Т- и В-лимфоцитов, соответственно. Процедуру подготовки для цитофлуориметрического исследования проводили по стандартным протоколам. Для исследования использовали проточный цитометр FC500 (Beckman Coulter, США).

Исследование пролиферативной активности клеток проводили с помощью метода определения пролиферации *ex tempore*, с использованием бромуридина и иммуноферментным определением включения метки с помощью набора реактивов («Amersham»). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm SEM$). Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ^2 . Статистически значимыми различия считались при $p < 0,01$.

Результаты. Селезенка новорожденных крыс контрольной группы представляла собой орган красного цвета, покрытый соединительнотканной капсулой. В селезенке визуализировались тонкие соединительнотканнные трабекулы. Выявлялось четкое разграничение органа на две зоны красную пульпу с большим скоплением гемопоэтических клеток и формирующуюся белую пульпу, представленную единичными примитивными очагами ПАЛМ.

Анатомические параметры селезенки, ее абсолютная и относительная масса у крыс, развивавшихся под воздействием ДДТ не отличались от контроля. Селезенка представляла собой продольное образование красного цвета, была покрыта капсулой, соединительнотканнные трабекулы не выявлялись. В отличие от контрольных животных, число формирующихся ПАЛМ было больше, количество артериол, вокруг которых наблюдалось скопление лимфоцитов, составляло примерно от одной до трех.

К возрасту 7 суток, селезенка крыс контрольной группы увеличилась в размерах. Она имела продольную форму, темно-красный цвет, сверху была покрыта соединительно-тканной капсулой. Вглубь органа от капсулы отходили соединительнотканнные трабекулы. В селезенке имелось разделение на две зоны- красную и белую пульпу. Красная пульпа представляла собой ретикулярную ткань со скоплением гемопоэтических клеток. Белая пульпа представляла собой ПАЛМ с формирующейся маргинальной зоной. Доля ПАЛМ имеющих маргинальную зону составляла $21,43 \pm 1,4\%$. Маргинальная зона состояла из гранулоцитов и мононуклеарных клеток.

У опытных крыс этого возраста анатомические параметры селезенки не отличались от контроля. Паренхима селезенки была так же представлена формирующимися ПАЛМ, но площадь белой пульпы и размеры ПАЛМ были больше по сравнению с контрольными животными. Большая часть ПАЛМ имели маргинальную зону, их доля составляла $53,97 \pm 3,41\%$, размеры маргинальной зоны также превышали контрольные цифры.

Исследование развития лимфоцитарных линий в селезенке, показало, что у новорожденных животных контрольной группы одну треть от всех лимфоцитов составляли CD45R-положительные лимфоциты, а их число у крыс, потреблявших ДДТ, было в два раза меньше. К возрасту 7-ми дней произошло уменьшение доли CD45R-положительных лимфоцитов в контрольной группе. Также и в опытной группе, численность лимфоцитов стала на 20% меньше, по сравнению с периодом новорожденности, и являлась статистически значимо меньшей, чем у крыс контрольной группы (рис.1).

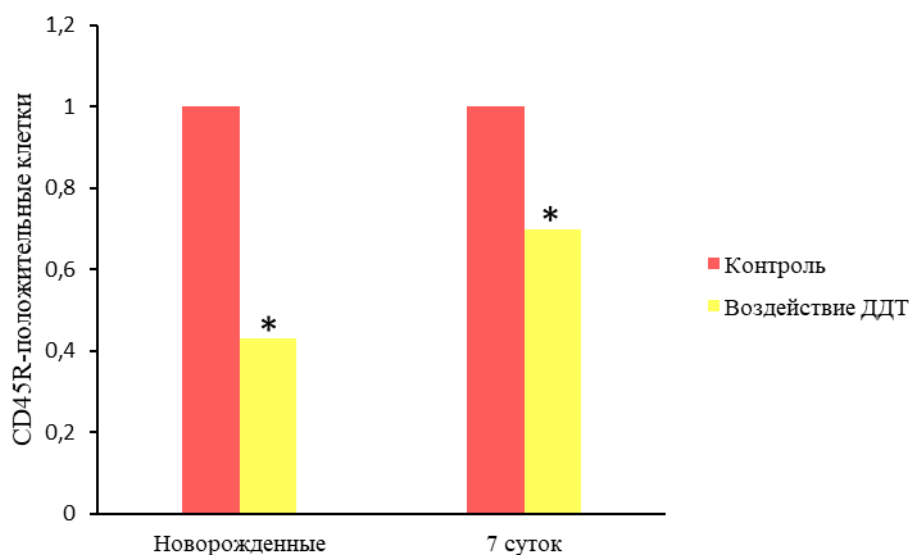


Рис. 1. Показатели CD45R-положительны лимфоцитов в селезенке новорожденных крыс и крыс в возрасте 7 суток. Здесь и далее * – статистически значимые отличия от контрольной группы.

Содержание CD3-положительных клеток в селезенке новорожденных крыс в обеих группах были одинаково низкими. К 7-м суткам в группе контрольных животных произошло увеличение показателей в 7 раз. В опытной группе рост был менее выраженным и процент CD3-положительных клеток был статистически значимо меньшим, чем у крыс контрольной группы того же возраста (рис. 2).

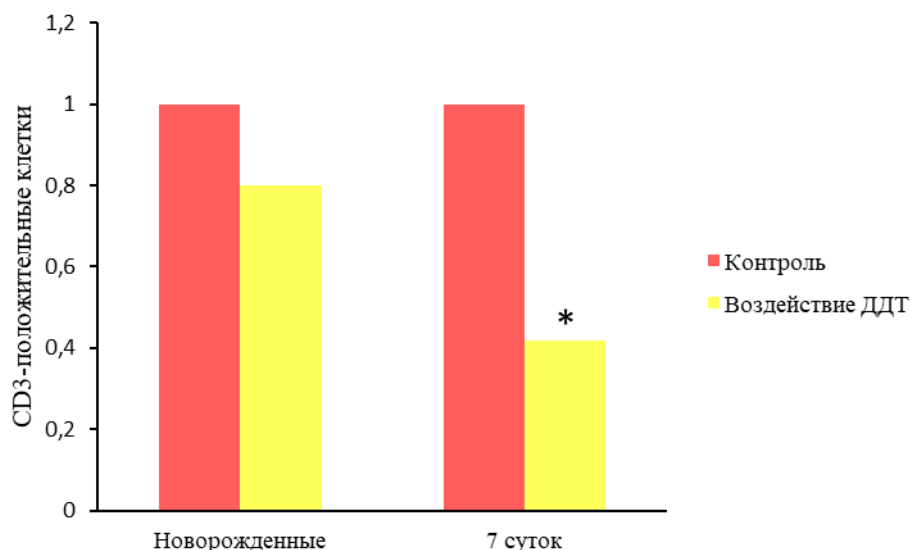


Рис. 2. Показатели CD3-положительных лимфоцитов в селезенке новорожденных крыс и крыс в возрасте 7 суток.

Исследования пролиферативной активности клеток селезенки *ex tempore* у новорожденных животных, показало высокую пролиферативную активность у крыс контрольной группы. В группе животных, подвергавшихся низкодозовому воздействию ДДТ, пролиферативный ответ был выше в три раза. В подсосном периоде у крыс опытной группы пролиферативный ответ также превышал контрольные значения в 2,6 раз.

Обсуждение. В развитии селезенки крыс в постнатальном периоде активно протекали три основных морфогенетических процесса: пролиферация, дифференцировка и миграция клеток. У крыс контрольной группы мы наблюдали активные процессы пролиферации в сочетании с дифференцировкой В-лимфоцитов и увеличивающейся миграцией Т-лимфоцитов, формирующих примитивную ПАЛМ. Сравнительный анализ показал, что у крыс, подвергавшихся в пренатальном и постнатальном развитии воздействию низких доз ДДТ, пролиферативные процессы протекали более активно, нежели процессы дифференцировки В-клеток. Несмотря на более быстрые темпы формирования ПАЛМ, то есть миграции Т-лимфоцитов, составляющих основную часть примитивной ПАЛМ, содержание Т-клеток было меньшим, как у новорожденных, так и 7-дневных крыс. Эти данные свидетельствуют о изменении процессов дифференцировки тимоцитов. Таким образом, у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ, в постнатальном развитии морфогенетические процессы были разобщены (рис.3).

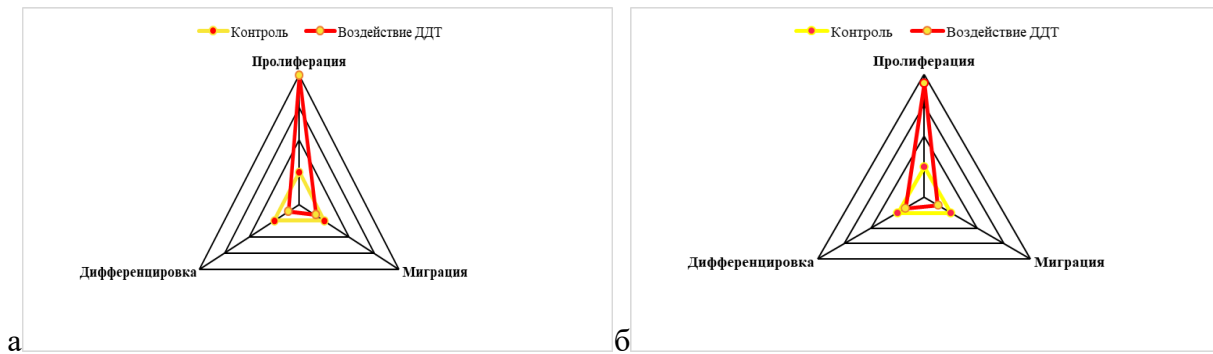


Рис. 3.

Отличие морфогенетических процессов у новорожденных крыс (а) и крыс в возрасте 7 суток (б)

Воздействие дисраптора стимулировало пролиферацию и миграцию, но замедляло созревание лимфоцитов. При этом явно наблюдались признаки ускоренного формирования структур белой пульпы. Полученные результаты согласуются с данными предыдущих исследований, показавших особенности развития тимуса при воздействии на организм низких доз ДДТ [2, 3].

Выводы. Таким образом, воздействие низких доз ДДТ нарушает координацию морфогенетических процессов, разобщая пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток в постнатальном развитии селезенки.

Список литературы

1. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С. и др. Морфофункциональные изменения коркового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста, потреблявших низкие дозы эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана с первого дня постнатального онтогенеза // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86, № 4. – С.70-76.
2. Яглова Н.В., Цомартова Э.С., Назимова С.В. и др. Морфологические изменения тимуса новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана во внутриутробном периоде развития // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 167, № 2. – С.261-264.
3. Яглова Н.В., Цомартова Э.С., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Кузнецов С.Л. Изменения пролиферативных процессов в тимусе крыс, подвергавшихся антенатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14, № 4. – С. 676-681.
4. Яглова Н.В. Механизмы дисрапторного действия дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на функционирование фолликулярных эпителиоцитов щитовидной железы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 8. – С. 196-199.
5. Basu N., Murugesan K., Bhide N.K. DDT levels in human body fat & milk samples from Delhi // Indian J Med Res. – 1991. – V. 94. – P. 115-118.

6. DeWitt, Jamie C., Heather B.P. Endocrine disruptors and the developing immune system // *Current Opinion in Toxicology*. – 2018. – V. 10. – P 31-36.
7. Nakamura K., Kariyazono H. Influence of Endocrine-disrupting Chemicals on the Immune System // *Journal of Health Science*. – 2010. – V. 56, N 4. – P. 361-373.
8. Perera F.P., Jedrychowski W., Rauh V., Whyatt R.M. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus // *Environ Health Perspect*. – 1999. – V. 107, N 3. – P. 451-460.
9. Stemmler I., Lammel G. Cycling of DDT in the global environment 1950-2002: World Ocean returns the pollutant // *Geophysical Research Letters*. – V. 36, N. 24. – doi: 10.1029/2009GL041340.
10. Timokhina E.P., Yaglov V.V., Nazimova S.V. Dichlorodiphenyltrichloroethane and the Adrenal Gland: From Toxicity to Endocrine Disruption // *Toxics*. – 2021. – V. 9, N 10. doi: 10.3390/toxics9100243.
11. Turusov V., Rakitsky V., Tomatis L. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks // *Environ Health Perspect*. – 2002. – V. 110, N. 2. – P. 125-128.
12. Van Dyk J.C., Bouwman H., Barnhoorn I.E., Bornman M.S. DDT contamination from indoor residual spraying for malaria control // *Sci Total Environ*. – 2010. – V. 408, N 13. – P. 2745-2752.
13. Workalemahu T., Grantz K.L., Grewal J. et al. Genetic and Environmental Influences on Fetal Growth Vary during Sensitive Periods in Pregnancy // *Sci Rep*. – 2018. – V. 8. – doi: 10.1038/s41598-018-25706-z.
14. Yaglova N.V., Nazimova S.V., Obernikhin S.S. et al. Developmental Exposure to DDT Disrupts Transcriptional Regulation of Postnatal Growth and Cell Renewal of Adrenal Medulla // *Int J Mol Sci*. – 2023. – V. 24, N 3. – doi: 10.3390/ijms24032774.
15. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Tsomartova D.A. et al. Impact of Prenatal and Postnatal Exposure to Endocrine Disrupter DDT on Adrenal Medulla Function // *Int J Mol Sci*. – 2022. V. 23, N 9. – doi: 10.3390/ijms23094912.
16. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V. et al. Ultrastructural Mechanisms of Impaired Aldosterone Synthesis in Rats Exposed to DDT during Prenatal and Postnatal Development // *Bull Exp Biol Med*. – 2020. – V. 170, N 1. – P. 101-105.