

УДК 576.3/7:591.1(053)+591.441

© Г. А. Мороз, Н. Ю. Озерова, 2010.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СЕЛЕЗЕНКИ ИНТАКТНЫХ КРЫС-САМЦОВ ЛИНИИ ВИСТАР 2-Х, 6-ТИ И 12-ТИ МЕСЯЧНОГО ВОЗРАСТА

Г. А. Мороз, Н. Ю. Озерова

*Кафедра нормальной анатомии (зав. кафедрой - проф. В. С. Пикалюк),
Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет
им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь*

STRUCTURAL ORGANIZATION OF SPLEEN OF INTACT 2-, 6 AND 12-MONTH-OLD MALE WISTAR RATS

G. A. Moroz, N. Yu. Ozerova

SUMMARY

The structural organization of spleen of intact 2-, 6- and 12-month-old males Wistar rats was studied using light and electronic-microscopic research methods. Age-related features of structural organization of spleen of 6- and 12-month-old males rats.

СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ СЕЛЕЗІНКИ ІНТАКТНИХ ЩУРІВ-САМЦІВ ЛІНІЇ ВІСТАР 2-Х, 6-ТИ І 12-ТИ МІСЯЧНОГО ВІКУ

Г. О. Мороз, Н. Ю. Озерова

РЕЗЮМЕ

За допомогою світлооптичного і електронно-мікроскопічного методів дослідження вивчена структурна організація селезінки інтактних 2-х, 6-ти та 12-ти місячних щурів-самців лінії Вістар. Виявлено вікової особливості структурної організації селезінки у 6-ти і 12-ти місячних щурів.

Ключевые слова: селезенка, гистоструктура, крысы линии Вистар, возраст.

Выраженность защитных реакций организма на внешние воздействия во многом зависит от морфофункционального состояния периферических органов иммуногенеза, и в частности, селезенки, играющей важную роль в поддержании гуморального и клеточного звеньев иммунитета. Известно, что иммунные органы в течение жизни претерпевают возрастную инволюцию, а при стрессовых воздействиях под действием глюкокортикоидов возможно развитие акцидентальной инволюции лимфоидной ткани [1, 2, 3].

На сегодняшний день в научной литературе достаточно много данных о возрастных особенностях строения центрального иммунного органа – тимуса. Вопросы же возрастных изменений селезенки освещены избирательно и не всегда всесторонне [4, 5, 6]. В основном приводятся данные полученные на т.н. «половозрелых» животных без конкретизации возраста по месяцам, что, на наш взгляд, может явиться причиной не совсем объективной оценки данных экспериментальных исследований. При этом в работах, посвященных изучению селезенки крыс для исследования повреждающего действия ряда физических факторов, зачастую освещаются вопросы мор-

фофункционального состояния органа без акцента на пол, возраст и линейность животных.

Цель исследования - установить возрастные особенности структурной организации селезенки интактных крыс-самцов линии Вистар 2-х, 6-ти и 12-ти месячного возраста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приведенные данные являются фрагментом экспериментальных исследований по изучению структурных преобразований в органах при систематическом воздействии гравитационных перегрузок. Изучали строение селезенки 18 интактных крыс-самцов линии Вистар трех возрастных групп (по 6 крыс в каждой), масса которых соответственно составляла: 1 гр. (двухмесячные) - 120-130 г, 2 гр. (шестимесячные) - 200-220 г и 3 гр. (двенадцатимесячные) - 260-280 г. Интактные крысы находились в стандартных условиях вивария. Для устранения воздействия сезонных колебаний на изучаемые показатели, опыт был проведен в осенне-зимний период года.

Забор, фиксацию материала и изготовление парафиновых блоков выполняли согласно общепринятым методикам работы с лимфоидными органами.

Изготавливали серийные поперечные срезы селезенки в области ворот толщиной 4-6 мкм. Для изучения структурных компонентов селезенки срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону, азур II-эозином, ставили ШИК-реакцию с докраской ядер гематоксилином Караца и импрегнировали азотнокислым серебром по Футу.

Детали гистологического строения изучали с помощью цитоморфологического комплекса на базе микроскопа Olympus CX31. Относительные площади структурных компонентов селезенки определяли статистическим методом Стефанова С.Б. (1985) с использованием таблиц Стрелкова Р.Б. (1980) для вычисления доверительного интервала. Количественные показатели обрабатывали с использованием методов вариационной статистики. Достоверными считали данные с погрешностью меньше 5 % ($p < 0,05$).

Для изучения ультраструктурных особенностей селезенки использовали трансмиссионную электронную микроскопию. Для этого материал забирали немедленно после забоя, фиксировали в 2,5% р-ре глютаральдегида на фосфатном буфере с дофиксацией в 1% р-ре OsO_4 и заливали в смесь эпон-аралдит. Готовили полутонкие и ультратонкие срезы, которые после окраски по Рейнольдсу просматривали и фотографировали на электронном микроскопе ПЭМ-125К Сумского ПО «Электрон».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При микроскопическом исследовании селезенки двухмесячных крыс капсула выглядит тонкой, местами имеет волнообразный ход. Состоит из плотной волокнистой соединительной ткани, содержащей фибробласты и гладкомышечные клетки. От ворот органа и в некоторых участках от капсулы в паренхиме отходят соединительнотканые трабекулы, в толще которых проходят артерии и вены, стенки которых имеют хорошо выраженную ШИК+ реакцию. Около сосудов отмечается скопление гладких миоцитов. Следует отметить, что местами гладкомышечные клетки капсулы и трабекул выглядят сокращенными. Такая картина наблюдается и в препаратах селезенки 2-й и 3-й возрастных групп. По-видимому, это объясняется частичным выбросом крови из органа в качестве компенсаторной реакции на гипоксию, вызванную использованием при забое крыс паров эфира.

В целом, на долю соединительнотканного компонента приходится $5,71 \pm 0,14\%$ общей площади среза селезенки. Паренхима органа представлена красной и белой пульпой, относительные площади которых соответственно составляют $73,57 \pm 0,19\%$ и $20,71 \pm 0,19\%$.

Красная пульпа включает в себя селезеночные тяжи и венозные синусы. Ее строма образована крупнопетливой сетью из ретикулярных волокон и клеток. Волокна сети равномерно расположены в разных направлениях, местами слегка извиты. Стенка

венозных синусов образована удлинёнными эндотелиоцитами, расположенными на базальной мембране. Ядра эндотелиоцитов имеют овальную форму с неровной кариолеммой. Цитоплазма содержит большое количество митохондрий и свободных рибосом. В просвете синусов выявляются форменные элементы крови, преимущественно эритроциты.

Снаружи базальной мембраны синусов расположены ретикулярные клетки, макрофаги, содержащие сидерофагосомы, эритроциты, тромбоциты и лимфоциты. Местами в селезеночных тяжах встречаются групповые скопления лимфоцитов. Реакция с Шифф-йодной кислотой выявляет немногочисленные ШИК-положительные вещества, равномерно распределенные в красной пульпе.

Белая пульпа представлена лимфатическими периартериальными влагалищами (ЛПАВ) и лимфатическими узелками (ЛУ), относительные площади которых составляют $63,79 \pm 0,14\%$ и $36,21 \pm 0,19\%$, соответственно.

В ЛПАВ, окружающих центральные артерии, выделяют собственно периартериальную область (ПАО) и маргинальную зону (МЗ), доли которых в общей площади периартериальных влагалищ составляют $34,93 \pm 1,09\%$ и $63,26 \pm 1,29\%$. Собственно периартериальная область на гистологических препаратах имеет более темную окраску, так как состоит преимущественно из малых лимфоцитов, а также концентрических слоев ретикулярных волокон и уплотненных ретикулярных клеток.

Маргинальная зона расположена на границе с красной пульпой, пронизана капиллярами, идущими от центральной артерии, и содержит ретикулярные клетки, малые и средние лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и плазмоциты.

Лимфатические узелки фактически являются продолжением ЛПАВ и обнаруживаются в местах разветвления центральных артериол. Ретикулярные волокна, также как и в периартериальных влагалищах, имеют циркулярную ориентацию вокруг артерии узелка.

В ЛУ визуально определяются: маргинальная зона (МЗ), периартериальная зона (ПАЗ), мантийная зона (МнЗ) и герминативный центр (ГЦ). Выявлено, что относительная площадь маргинальной зоны занимает около половины общей площади узелка ($51,56 \pm 1,98\%$), соответственно на долю остальных зон приходится: ПАЗ - $5,46 \pm 0,70\%$, МнЗ - $32,52 \pm 1,30\%$, ГЦ - $8,61 \pm 0,87\%$. Герминативные центры обнаружены нами в большинстве ЛУ, что подтверждает данные Кузив О.Э. [7], которая считает, что это обусловлено лимфопоэтической функцией селезенки крыс с постоянным поступлением в организм антигенов с пищей.

ПАЗ на гистопрепаратах выглядит темной, занимает наименьший участок лимфатического узелка и расположена эксцентрично, окружая его артерию.

От артерии отходят капилляры, которые пронизывают зону между плотно расположенными лимфоцитами. В лимфоцитарной популяции ПАЗ преобладают малые формы. Ядра этих клеток овальные, содержат конденсированный гетерохроматин. Цитоплазма их бедна органеллами.

Герминативные центры окрашиваются менее интенсивно в сравнении с другими зонами узелков из-за меньшей плотности клеток, так как содержат много больших лимфоцитов, дендритные клетки и макрофаги. Характерной ультраструктурной особенностью макрофагов является значительное содержание в их цитоплазме лизосом и фагосом. Выявляются плазмциты и клетки на разных стадиях митоза, а также отдельные апоптотические тела. По периферии ГЦ обнаруживаются ШИК-положительные элементы.

Мантийная зона узелка хорошо выражена, окружает ПАЗ и ГЦ. Содержит малые и средние лимфоциты, встречаются плазмциты, а также немногочисленные дендритные, ретикулярные клетки и макрофаги. Клетки лежат плотно между прослойками однородных циркулярно-направленных ретикулярных волокон. Мантийную зону окружает маргинальный синус, который сообщается с капиллярной сетью ЛУ. Стенка его выстлана эндотелиальными клетками, имеет щели. По периферии синуса обнаруживаются макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты, которые образуют внутренний слой маргинальной зоны лимфатического узелка.

Маргинальная зона содержит большое количество ретикулярных клеток, средних лимфоцитов, встречаются большие формы лимфоцитов, что характеризует ее как зону высокой миграционной активности. Обнаруживаются макрофаги, а также плаз-

матические клетки на разных стадиях развития. Выявляются эритроциты и тромбоциты, при этом граница между МЗ и красной пульпой достаточно четкая. Гистологическое исследование препаратов селезенки 6-ти и 12-ти месячных крыс не выявило принципиальных отличий в строении органа, но позволило установить ряд морфометрических особенностей его структурной организации. Прежде всего, это касается процентного соотношения долей соединительнотканного компонента, красной и белой пульпы, а также распределения относительных площадей зон в лимфоидной ткани.

Так, в препаратах селезенки 6-ти месячных крыс в сравнении с 2-х месячными животными отмечается увеличение доли соединительнотканного компонента до $6,70 \pm 0,10\%$ ($p < 0,05$). Увеличивается и процентное содержание белой пульпы, которая занимает $27,14 \pm 0,24\%$ ($p < 0,05$) общей площади паренхимы. Доля красной пульпы уменьшается до $66,79 \pm 0,29\%$ ($p < 0,05$).

Процентное содержание ЛУ и ЛПАВ в белой пульпе соответственно составляет $36,84 \pm 0,19\%$ и $63,16 \pm 0,24\%$. В общей площади лимфатических периартериальных влагалищ на доли ПАО и МЗ приходится $30,95 \pm 0,54\%$ и $67,11 \pm 0,63\%$ соответственно.

Подавляющее большинство лимфатических узелков содержит герминативные центры с относительно большим количеством клеток с картинами митозов, что свидетельствует об их функциональной зрелости.

При этом, в сравнении с 2-х месячными крысами, также как и в ЛПАВ, в лимфатических узелках отмечается достоверное уменьшение относительной площади Т-зависимой зоны (ПАЗ). Процентное соотношение зон в ЛУ представлены в таблице.

Относительные показатели (в %) площадей зон белой пульпы селезенки интактных крыс

ЛУ				ЛПАВ	
ПАЗ	МЗ	МнЗ	ГЦ	МЗ	ПАО
2-х месячные крысы					
$5,46 \pm 0,27$	$51,56 \pm 0,64$	$32,52 \pm 1,30$	$8,61 \pm 0,87$	$63,26 \pm 1,29$	$34,93 \pm 1,09$
6-ти месячные крысы					
$4,16 \pm 0,24^*$	$52,67 \pm 1,01$	$35,13 \pm 0,80$	$8,71 \pm 1,05$	$67,11 \pm 0,63^*$	$30,95 \pm 0,54^*$
12-ти месячные крысы					
$4,38 \pm 0,23^*$	$54,41 \pm 0,93^*$	$33,22 \pm 0,85$	$8,01 \pm 0,87$	$65,95 \pm 0,71$	$33,15 \pm 0,64$

Примечание: * - $p < 0,05$ относительно данных 2-х месячных крыс.

В селезенке 12-ти месячных крыс на долю капсулы и трабекул приходится $6,43 \pm 0,10\%$ площади поперечного среза органа. Соединительнотканная структура, и прежде всего трабекулы, хорошо визуализи-

руются, дают выраженную ШИК+ реакцию в основном за счет утолщенных стенок, проходящих в них, кровеносных сосудов. В паренхиме органа доля белой пульпы в сравнении с 6-ти месячными крысами

уменьшается до $22,14 \pm 0,29\%$ ($p < 0,05$), красной – увеличивается ($71,43 \pm 0,24\%$ ($p < 0,05$)), при этом отмечается размытость границы между ними. В сравнении с интактными животными 1-й и 2-й возрастных групп в белой пульпе выявляется увеличение процентного содержания лимфатических узелков ($43,55 \pm 0,14\%$ ($p < 0,05$)), что, по-видимому, можно объяснить возрастанием естественных «антигенных атак» в процессе увеличения возраста животных.

При сопоставлении показателей относительных площадей структурных зон ЛУ животных этой группы с аналогичными показателями 2-х месячных крыс отмечается достоверное увеличение доли маргинальной зоны (см. табл.). В свою очередь, на долю ЛПАВ в белой пульпе приходится $56,45 \pm 0,29\%$. Относительные площади ПАО и МЗ в лимфатических периартериальных влагиалищах соответственно составляют $33,15 \pm 0,64\%$ и $65,95 \pm 0,71\%$.

ВЫВОДЫ

Полученные нами данные строения селезенки 2-х, 6-ти и 12-ти месячных крыс в определенной степени дополняют картину гистологической характеристики органа разных периодов постнатального онтогенеза и, в основном, согласуются с литературными данными строения нормальной селезенки крыс. При этом выявлено ряд особенностей структурной организации органа в зависимости от возраста. Так, белая пульпа селезенки шестимесячных крыс представлена функционально активными лимфоидными структурами, с высоким уровнем лимфоцитопоза, что подтверждается наличием большого количества лимфатических узелков, содержащих ГЦ с выраженной митотической активностью. У двенадцатимесячных крыс выявлено увеличение относительной доли соединительнотканного компонента селезенки, изменение соотношения относительных площадей красной и белой пульпы. Наблюдается уменьшение относительных показателей площадей Т-зависимых зон, что можно объяснить снижением поступления в селезенку Т-лимфоцитов из претерпевающего возрастную инволюцию тимуса. На этом фоне увеличение относительной площади маргинальной зоны ЛУ и ЛПАВ свидетельствует об активации миграции ре-

циркулирующего пула Т- и В-лимфоцитов, что обеспечивает определенную стабильность иммунологического статуса начинающего стареть организма.

Выявленные возрастные особенности строения селезенки крыс-самцов линии Вистар позволят нам более объективно оценивать результаты опытов с гипергравитационным воздействием, а также могут быть учтены другими исследователями для получения собственных достоверных данных. В дальнейшем планируются цитометрическое и иммуногистохимическое исследования селезенки интактных и подвергавшихся воздействию гравитационных перегрузок крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сапин М. Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит / М. Р. Сапин, Д. Б. Никитюк. – М. : Джангар, 2000. – 184 с.
2. Мороз Г. А. Строение тимуса интактных крыс-самцов линии Вистар разного возраста / Г. А. Мороз // Світ медицини та біології. – 2009. – № 3, ч. II. – С. 98–102.
3. Melanie S. Spoor, Zaher A. Radi and Robert W. Dunstan. Characterization of Age- and Gender-related Changes in the Spleen and Thymus from Control Cynomolgus Macaques Used in Toxicity Studies / M. S. Spoor, Z. A. Radi, R. W. Dunstan // Toxicologic Pathology. – 2008, № 36. – P. 695–704.
4. Морфологические особенности селезенки интактных крыс периода старческих изменений : зб. матеріалів наукового конгресу «IV міжнародних Пироговських читань», V з'їзду анатомів, гістологів, умбріологів і топографоанатомів України, (Вінниця 2–5 червня 2010 р.), – Вінниця : «Нілан ЛТД», 2010. – С. 109–110.
5. Mark F. Cesta. Normal structure, function and histology of the spleen / M. F. Cesta // Toxicologic Pathology. – 2006, № 34. – P. 455–465.
6. Морфологічна характеристика світлих центрів лімфоїдних вузликів білої пульпи селезінки щурів-самців різних вікових груп у нормі / М. Ю. Кочмарь, А. О. Гербут, В. Й. Палапа [та ін.] // Вісник морфології. – 2010. – Т. 16, № 2. – С. 297–300.
7. Кузів О.Є. Морфологія лімфоїдних органів в умовах повного голоду / О.Є. Кузів – Тернопіль, 1997. – 174 с.