



О.А. Апт, О.С. Таланова

Особливості морфогенезу білої пульпи селезінки щурів у ранньому післянатальному періоді онтогенезу в нормі та після внутрішньоплідного введення антигенів різної природи

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: селезінка, біла пульпа, періартеріальна лімфоїдна муфта, морфогенез, внутрішньоплідне введення антигенів.

Ключевые слова: селезенка, белая пульпа, периаартериальная лимфоидная муфта, морфогенез, внутриплодное введение антигенов.

Key words: spleen, white pulp, periarterial lymphoid sheathes, morphogenesis, intrauterine antigens injection.

Вивчено особливості морфогенезу морфофункціональних зон білої пульпи селезінки білих щурів у різні терміни після народження в нормі та після внутрішньоплідного введення антигенів. Встановлено, що внутрішньоплідне введення антигенів різної природи призводить до розвитку спленомегаїї, тривалість якої залежить від виду антигена. Відзначено, що процес становлення морфофункціональних зон білої пульпи має стадійний характер. Незалежно від типу внутрішньоплідно введеного антигену, після народження спостерігається прискорення формування внутрішньої зони періартеріальних лімфоїдних муфт і стінки центральної артерії.

Исследованы особенности строения морфофункциональных зон белой пульпы селезенки белых крыс в разные сроки после рождения в норме и после внутриплодной антигенной стимуляции. Установлено, что внутриплодное введение антигенов различной природы приводит к развитию спленомегалии, длительность которой зависит от вида антигена. Отмечено, что процесс становления морфофункциональных зон белой пульпы носит стадийный характер. Независимо от вида внутриплодно введенного антигена, после рождения наблюдается ускорение формирования внутренней зоны периаартериальных лимфоидных муфт и стенки центральной артерии.

In this work describes peculiarities of rat's splenic white pulp morphofunctional zones structure in depending on different terms after the birth in norma and after intrauterine injection of antigen. Established that intrauterine injection of antigens with different nature leads to the megalosplenia progress. Duration of megalosplenia depends on type of injected antigen. It was noted that formation process of morphofunctional zones of white pulp has a stepwise character. It was shown that after the birth acceleration of inner periarterial lymphoid sheathes and central artery wall formation is occurred independently of intrauterine injected antigen type.

В останні десятиріччя відзначається суттєве погіршення екологічних умов життя людини, зумовлене появою значної кількості білкових і синтетичних полімерів, що сприяють збільшенню навантаження на імунну систему на всіх етапах розвитку організму. Ці фактори роблять питання про розкриття механізмів формування імунологічної толерантності плоду до власних і чужорідних антигенів однією з центральних проблем медицини [5,7]. Вивчення особливостей становлення морфофункціональних зон периферійних лімфоїдних органів, зокрема селезінки, протягом перших тижнів життя в нормі та після антенатального впливу антигенів різного походження дозволить підійти до вирішення цієї проблеми та вдосконалити методи діагностики і корекції імунodefіцитних станів у новонароджених.

Мета роботи

Вивчення закономірностей морфогенезу та особливостей будови білої пульпи селезінки щурів у ранньому післянатальному періоді в нормі та після внутрішньоплідного введення антигенів різної природи.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження була селезінка 163 білих щурів лінії Вістар віком від 1 до 30 доби післянатального життя. Тварин розподілили на 4 групи: перша – інтактні

щури (38); друга (контрольна) – тварини після внутрішньоплідного введення фізіологічного розчину (22); третя – щури, яким внутрішньоплідно вводили імуноглобулін (50); четверта – тварини після внутрішньоплідного введення вакцини паротиту (53).

Внутрішньоплідне введення фізіологічного розчину й антигенів здійснювали під час лапаротомії, на 18-й добі датованої вагітності, шляхом кризьматочної, кризьоболонкової підшкірної ін'єкції обсягом 0,05 мл кожному з плодів за методом М.А. Волошина (1981). За антигени обрано імуноглобулін людини нормальний в дозі 0,165 мг білка й вакцину живу паротитну суху, яку вводили у дозі 25 ГАТЕ50. Забій тварин проводили з 13:00 до 14:00 шляхом декапітації. Визначали масу селезінки в абсолютних і відносних величинах. Для гістологічного та гістохімічного дослідження шматочки органу фіксували у суміші Буена, а також у 10% нейтральному формаліні. Серійні парафінові зрізи завтовшки 5–6 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином; використовували ШПК-реакцію з дофарбуванням ядер гематоксиліном.

Гістохімічне виявлення та диференціювання вуглеводовміщуючих біополімерів проводили за схемою, запропонованою А.П. Авциним, А.І. Струковим і Б.Б. Фуксом (1971). Вивчали гістохімічні відмінності морфофункціонального стану зовнішньої та внутріш-

ньої зон періартеріальних лімфоїдних муфт (ПАЛМ). Гістохімічне виявлення рецепторів до лектину арахісу проводили з використанням стандартного набору НВК «лектинотест» у нашій модифікації (посвідчення на раціоналізаторські пропозиції №1561, №1562).

На зрізах селезінки вивчали відносну площу червоної та білої пульпи, морфологічних зон білої пульпи (ПАЛМ, лімфоїдних вузликів, маргінальної зони), елементів стромы. У ПАЛМ підраховували відносну кількість малих, середніх і великих лімфоцитів (до цієї групи клітин відносили лімфобласти), ретикулярних клітин, фібробластів і фіброцитів (одна група), макрофагів, тілець Флемінга, плазмоцитів і клітин з фігурами мітозу. Після проведення гістохімічного виявлення рецепторів до лектину арахісу встановлювали кількість мічених PRN-HRP лімфоцитів (PNA⁺ лімфоцити) у Т-залежних зонах селезінки. Кількісний морфометричний облік клітин проводили за допомогою окулярної сітки С.Б. Стефанова. Порівняння середніх величин проводили за показниками критерію Фішера-Стьюдента. Розбіжності двох середніх вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У інтактних новонароджених тварин біла пульпа селезінки представлена ПАЛМ, з яких $85,7 \pm 1,7\%$ мають площу менше 5000 мкм^2 . Вони складаються з 3–4 шарів переважно середніх лімфоцитів, більшість з яких лектинпозитивні, відокремлені від червоної пульпи розташованими по периферії фібробластами та колагеновими волокнами, що відповідає даним інших авторів [6]. У центрі Т-залежної зони визначається артерія, в стінці якої чітко диференціюється тільки внутрішня оболонка. З 3-ї доби життя виявляється маргінальна зона, представлена 2–3 шарами лімфоцитів, ретикулярних клітин, фібробластів і маргінальним синусом. Відносна площа ПАЛМ зростає за рахунок розширення Т-залежних зон та їхнього новоутворення. Абсолютна площа ПАЛМ збільшується, досягає максимуму на 7-му добу ($11802 \pm 2816 \text{ мкм}^2$), зменшується наприкінці другого тижня ($10843 \pm 1663 \text{ мкм}^2$) та майже не змінюється до 30-ї доби. Зростання площі Т-залежних зон пов'язано з появою великих лімфоїдних муфт на 3-тю добу та збільшенням їхньої кількості до 7-ї доби життя. Одночасно зменшується обсяг ПАЛМ малих розмірів. Кількість середніх муфт з 3-ї по 30-ту добу майже не змінюється. Закінчення формування стінки центральної артерії відзначається на 5-ту добу. Навколо артерій Т-залежних зон постійно виявляються судини мікроциркуляторного русла, заповнення яких лімфоцитами хвилеподібно змінюється протягом першого місяця життя. З 1-ї до 5-ї доби життя у структурах внутрішньої зони ПАЛМ і стінці центральної артерії спостережено інтенсивне накопичення амілазореzистентних глікопротеїдів і високосульфатованих глікозаміногліканів.

Для клітинної популяції Т-залежних зон характерне збільшення частки середніх (з $37,96 \pm 1,91$ до $60,15 \pm 1,55\%$) і зменшення вмісту великих лімфоцитів (з $21,04 \pm 1,91\%$ до $9,02 \pm 1,04\%$) до 7-ї доби життя у інтактних тварин. У цьому віці зафіксоване статистично вірогідне падіння відносної кількості ретикулярних клітин фібробластів в ПАЛМ. З 14-ї доби в Т-залежних зонах селезінки інтактних і контрольних щурів знижується частка середніх лімфоцитів і збільшується вміст лімфоцитів малого діаметру. Подібні дані наведено в роботі М.Р. Сапіна [4] стосовно клітинної популяції періартеріальних лімфоїдних муфт у селезінці людини. Найбільша мітотична активність, відзначена на першу ($1,22 \pm 0,32\%$), 5-ту ($1,2 \pm 0,31\%$) та 30-ту добу життя, що, можливо, є відображенням процесу становлення популяції пулу цитотоксичних лімфоцитів у селезінці в цей період [7]. Кількість PNA⁺ лімфоцитів стає більшою з моменту народження до 5-ї доби, знижується на 7-му, а потім знову підвищується. Отже, до 5-ї доби у інтактних і контрольних тварин відбувається становлення внутрішньої зони ПАЛМ. З 5-ї доби виявляються численні лімфоїдні вузлики, що формуються; виникнення гермінативних центрів в них визначається у віці 2 тижні, досягаючи максимального розвитку на 30-ту добу життя, що корелює з результатами М.А. Волошина і співавт. [2].

Після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну у тварин зростає відносна площа білої пульпи за рахунок більш ранньої появи маргінальної зони, а також збільшення площі та кількості ПАЛМ (середня площа Т-залежних зон – $3083 \pm 801 \text{ мкм}^2$ і $5876 \pm 1132 \text{ мкм}^2$ відповідно). Максимум абсолютної площі ПАЛМ у тварин цієї групи, як і у інтактних тварин, відзначено на 7-му добу (на 2 доби раніше, ніж у контролі), спостерігається масовий початок утворення лімфоїдних вузликів.

У клітинній популяції, в порівнянні з контролем, виявлено вищий відсотковий вміст лімфоцитів середнього розміру ($37,96 \pm 1,91\%$ і $14,21 \pm 1,14\%$ відповідно). Протягом перших 3 діб життя відзначено збільшення макрофагоцитарної активності, підвищення кількості клітин з фігурами мітозу та PNA⁺ лімфоцитів у ПАЛМ. Максимум вмісту таких лімфоцитів ($6 \pm 0,9$ кл. на 1000 мкм^2) у Т-залежних зонах селезінки у експериментальних тварин спостерігають на 3-тю добу, тобто на 2 доби раніше, ніж у інтактних щурів. У структурах внутрішньої зони ПАЛМ та стінці центральної артерії з першої до 3-ї доби виявляється вищий вміст амілазореzистентних глікопротеїдів і високосульфатованих глікозаміногліканів.

Далі відзначено прогресивне збільшення площі білої пульпи, що випереджає її розвиток у інтактних щурів. Швидше ніж у контролі поширюється маргінальна зона, формуються лімфоїдні вузлики, в яких на 14-ту добу життя виявляються початкові етапи утворення гермінативних центрів. Абсолютна площа ПАЛМ досягає максимуму на 5-ту добу ($11246 \pm 1985 \text{ мкм}^2$), потім знижується наприкінці 2 тижня ($8492 \pm 1795 \text{ мкм}^2$) і зростає до 30-ї доби життя.

З 3-ї до 14-ї доби склад клітинної популяції ПАЛМ майже не відрізняється від показників для інтактних тварин. Від 14-ї до 30-ї доби відзначено підвищений вміст лімфоцитів малого діаметру й зменшення кількості середніх лімфоцитів, у порівнянні з контрольними щурами того ж віку (на 30-ту добу: малих лімфоцитів – $37,19 \pm 3,41\%$ і $43,83 \pm 1,95$; середніх лімфоцитів – $45 \pm 2,99\%$ і $38,83 \pm 2,22\%$ відповідно). Кількість PNA⁺ лімфоцитів у Т-залежних зонах досягає максимуму на 3-й добі, знижується на 5-й день і надалі збільшується до показників контролю. Темпи накопичення амілазореzистентних глікопротеїдів і високосульфатованих глікозаміногліканів сповільнюються, і вміст сполук цих класів у ПАЛМ майже не відрізняється від показників інтактних тварин з 7-ї до 30-ї доби життя.

Відносна площа білої пульпи у тварин, яким вводили вакцину паротиту, після народження перевищує дані контролю ($1,19 \pm 0,95\%$ і $4,55 \pm 1,64\%$ відповідно) і в подальшому розвивається швидшими темпами, ніж у інтактних тварин. У новонароджених щурів даної групи, на відміну від контролю, виявляються великі ПАЛМ, оточені маргіальною зоною, що починає формуватись. Т-залежні зони у цих тварин прогресивно збільшуються до 5-ї доби життя. Утворення лімфоїдних вузликів у таких щурів до 3-ї доби життя запізнюється, порівняно з контролем і тваринами після антенатального введення імуноглобуліну. Швидшими темпами, ніж у інтактних щурів, відбувається становлення стінки центральної артерії, усі оболонки якої чітко диференціюються на 5-ту добу.

У клітинній популяції ПАЛМ у новонароджених тварин 4-ї групи виявляється вірогідно більше середніх лімфоцитів ($37,96 \pm 1,91\%$ і $48,96 \pm 2,92\%$ відповідно), ніж у контролі, та менше лімфоцитів великого діаметру, кількість яких нижча протягом 5 днів життя. Відразу після народження в ПАЛМ тварин експериментальної групи частіше виявляються макрофаги, тільця Флемінга й клітини з фігурами мітозу. Кількість PNA⁺ лімфоцитів у Т-залежних зонах протягом перших 3-х діб життя значно перевищує показники контролю (на 3-тю добу – $2,1 \pm 0,3$ і $7,5 \pm 1,4$ клітини на 1000 мкм^2 відповідно). На 5-й день відзначено зниження їхньої кількості, що випереджає динаміку PNA⁺ лімфоцитів у контролі на 2 доби. Це може бути пов'язане з прискоренням масового виходу незрілих лімфоцитів з тимусу та їх впливом на формування мікрооточення й стромальних елементів у периферійних лімфоїдних і паренхіматозних органах [1]. У внутрішніх шарах ПАЛМ і стінці центральної артерії протягом перших 5-ти діб життя відзначено прискорення накопичення амілазореzистентних глікопротеїдів і високосульфатованих глікозаміногліканів.

Надалі площа білої пульпи у щурів після внутрішньоплідного введення вакцини паротиту збільшується швид-

ше, ніж у інтактних тварин, за рахунок випереджаючого зростання ПАЛМ та маргіальної зони. З 14-ї до 30-ї доби відносна площа лімфоїдних вузликів у тварин цієї групи нижча показників контролю. Абсолютна площа Т-залежних зон сягає максимуму на 7-й добі, зменшується на 14-ту, значно зростає наприкінці першого місяця життя та є найбільшою серед усіх груп тварин.

З 7-ї до 14-ї доби відзначено збільшення вмісту великих лімфоцитів і зниження кількості лімфоцитів малого діаметру в ПАЛМ тварин після внутрішньоочеревинного введення вакцини паротиту. На 30-й добі у клітинній популяції Т-зон селезінки цих тварин стає більше лімфоцитів малого діаметру та менше середніх і великих лімфоцитів, порівняно з контролем. Кількість лімфоцитів з рецепторами до лектину арахісу зростає у період з 5-ї до 30-ї доби. Темпи накопичення амілазореzистентних глікопротеїдів та високосульфатованих глікозаміногліканів з 7-ї доби знижуються та майже не відрізняються від показників інтактних тварин такого ж віку.

Висновки

1. Динаміка співвідношення білої та червоної пульпи селезінки в ранньому післянатальному періоді онтогенезу характеризується прогресивним зростанням площі білої пульпи до 30-ї доби життя. Формування білої пульпи має стадійний характер. На першій стадії (від моменту народження до 5-ї доби) відбувається становлення внутрішньої зони ПАЛМ і стінки центральної артерії; протягом другої стадії (до 14-ї доби) формується зовнішня зона ПАЛМ і маргіальна зона, розпочинається утворення лімфоїдних вузликів; третя стадія (з 14-ї до 30-ї доби) характеризується завершенням формування лімфоїдних вузликів і морфологічного комплексу: ПАЛМ – лімфоїдний вузлик – маргіальна зона. Внутрішньоплідний вплив антигенів призводить до збільшення площі білої пульпи у новонароджених тварин і прискорення формування внутрішньої зони ПАЛМ.

2. Площа й кількість ПАЛМ у інтактних і контрольних щурів збільшується з 1-ї до 7-ї доби життя з наступним зменшенням її абсолютної площі на 14-й день і стабілізацію розмірів до 30-ї доби.

3. У клітинній популяції ПАЛМ інтактних тварин першого тижня життя переважно виявляються лімфоцити середнього діаметру, кількість яких знижується до 14-ї доби. Внутрішньоплідне введення антигенів призводить до збільшення вмісту малих і середніх лімфоцитів і зниження кількості лімфоцитів великого діаметру у ПАЛМ новонароджених. Протягом першого місяця життя у інтактних та експериментальних тварин динаміка кількості муфт з малим діаметром збігається зі змінами сумарного вмісту середніх і великих лімфоцитів, а великих ПАЛМ – з динамікою малих і середніх лімфоцитів.

4. Розвиток ПАЛМ характеризується поступовою зміною синтезу й накопиченням вуглеводвмісних біополімерів у фібробластах, фіброцитах, ретикулярних клітинах і стінці центральної артерії у такій послідовності: амілозолабільні й сіаловміщуючі глікопротеїди – амілазорезистентні глікопротеїди; нессульфатовані глікозаміноглікани – високосульфатовані глікозаміноглікани.

5. У Т-залежних зонах кількість PNA⁺ лімфоцитів зростає з 1-ї до 5-ї доби, знижується на 7-й день і в подальшому збільшується. Внутрішньоплідне введення антигенів викликає підвищення кількості лектин-позитивних лімфоцитів у новонароджених, випереджаючи зростання їхньої кількості до 3-ї доби з наступним зниженням на 2 доби раніше, ніж у інтактних тварин.

Література

1. Волошин Н.А. Лимфоцит – фактор морфогенеза / Н.А. Волошин // Запорожский медицинский журнал. – 2005. – №3. – С. 122.
2. Волошин Н.А. Внутривисцеральная антигенная стимуляция как модель для изучения морфогенеза органов / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева, О.Г. Куш, М.С. Щербаков, М.Б. Вовченко, А.А. Светлицкий, С.В. Чугин // Морфологические ведомости. – 2006. – №1–2. – С. 57–59.
3. Луцик А.Д. Рецепторы лектинов в морфогистохимической характеристике органов и тканей: автореф. дис. ... д-ра мед. н. / А. Д. Луцик – М., 1989. – С. 6–31.
4. Сапин М.Р. Цитоархитектоника белой пульпы селезенки у людей различного возраста / М.Р. Сапин, Е.Ф. Амбарцумян // Архив АГЭ. – 1990. – Т.98, вып. 12. – С. 5–13.
5. Юрина Н.А. Соединительная ткань: развитие, строение и функция клеток и межклеточного вещества / Н.А. Юрина, А.И. Радостина. – М.: Наука, 1987. – 121 с.
6. Gomariz R.P. Postnatal development of the splenic white pulp in the Golden Hamster *Mesocricetus Auratus*. The Periarterial Lymphoid Sheath (PALS) / R.P. Gomariz, L. De Cardenas, A. Zapata // Tissue and Cell. – 1989. – Vol. 21, №3. – P. 403–417.
7. Miller J.F. The discovery of the immunological function of the thymus / Miller J.F. // Immunology Today. – 1991. – Vol. 12, №1. – P. 42–44.

Відомості про авторів:

Апт О.А., к. мед. н., асистент каф. анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії ЗДМУ.

Таланова О.С., аспірант каф. анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії ЗДМУ.

Адреса для листування:

Апт Ольга Анатоліївна. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 24, каф. анатомії людини ЗДМУ.

Тел.: (061) 233 33 56, (050) 578 80 00.

E-mail: mashaapt@mail.ru