

DOI 10.26724/2079-8334-2019-4-70-183-187

УДК 591.44: 615.375

Р.Ф. Амінов, В.К. Сирцов¹, О.В. Федоссева¹, О.К. Фролов
Запорізький національний університет, Запоріжжя
¹Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя

МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ СЕЛЕЗІНКИ ТА ТИМУСУ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ *HIRUDO VERBANA*

e-mail: 91_amin_91@ukr.net

Робота була спрямована на дослідження морфологічних показників селезінки та тимусу щурів на фоні впливу сольового екстракту *Hirudo verbana*. Самцям внутрішньочеревинно вводився стандартизований сольовий екстракт із тіл медичної п'явки, два рази до злучки із самцями та два рази після. Після вигодовування приплоду на 60 добу після останнього введення речовини, самиць та їх приплод у динаміці на 15, 30, 45 та 60-ту добу постембріонального онтогенезу піддавали декапітації. Аналізували білу пульпу селезінки – площу та діаметр лімфатичних фолікулів, центральних артерій та кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) у лімфоїдному фолікулі, у тимусі – кількість клітин на одиницю площі, як в кірковій, так і мозковій речовині. Під впливом біологічно активних речовин медичної п'явки у білій пульпі селезінки збільшуються розміри лімфоїдних фолікулів та центральних артерій, підвищується кількість лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) лімфоїдному фолікулі, а у тимусі приплоду, як в кірковій, так і мозковій речовині збільшується кількість клітин на одиницю площі (400 мкм²), виявляється переважання кіркової над мозковою речовиною. У результаті дослідження виявлено стимулюючий вплив сольового екстракту *Hirudo verbana* на імуногенез у центральних та периферійних органах імунної системи.

Ключові слова: медична п'явка, гірудотерапія, морфогенез, селезінка, тимус

Робота є фрагментом НДР «Біотехнологія перспективних кільцеців з вивченням імуотропної дії їх біологічно активних речовин», № державної реєстрації 0117U000704.

Одним із центральних лімфоїдних органів імунної системи є тимус, який переважно визначає стан периферійних органів імунної системи, імуногенезу, а також захисні реакції всього організму [2, 6]. Селезінка є важливим периферичним лімфоїдним органом кровотворення та імунного захисту. Однією із найважливіших функцій селезінки є імунна, яка полягає в захопленні та знешкодженні макрофагами шкідливих речовин, очищення крові від чужорідних агентів. Окрім того, макрофаги та інші антигенпрезентуючі клітини через корецепторні структури та цитокіни активують лімфоцитарні імуногенезні реакції. Тому, при будь-якому порушенні антиген структурного гомеостазу виникають морфологічні зміни в селезінці: бласттрансформація та проліферація лімфоцитів [6]. Під дією різних несприятливих факторів порушується будова лімфоїдних органів імунної системи змінюється взаємозв'язок імунокомпетентних клітин, вміст в них біологічно активних речовин [3, 4].

Важливо, що в процесі еволюції від нижчих хребетних до вищих створюється оптимальна структура та локалізація органів імунної системи, але повною мірою не відділяються від органів кровотворення. Незважаючи на значну кількість робіт щодо впливу біологічно активних речовин медичної п'явки на організм тварини [7] та людини [10], нам не вдалося знайти робіт, які б демонстрували гістологічну будову цього органу за впливу сольового екстракту *Hirudo verbana*. Медична п'явка (МП) є одним із перспективних продуцентів понад 100 унікальних біологічно активних речовин (БАР), що не мають аналогів у світі та необхідні в сучасній ветеринарії та медицині — гірудин, егліни, бделіни, ферменти: гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза та ін. Використання медичних п'явок у гірудотерапії обумовлено широким спектром терапевтичної дії їх БАР: регуляцією гемостазу та судинного тону, протизапальним, регенераційним, нейротропним, бактеріостатичним, імуномодуляторним ефектами [7, 8].

Метою роботи було дослідити стан лімфоїдних органів самиць після вигодовування приплоду, їх приплід у динаміці на 15, 30, 45 та 60-добу постембріонального онтогенезу.

Матеріал і методи дослідження. Робота виконана на 40 білих лабораторних щурах-самицях та 200 їх приплоду. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному харчовому

раціоні в індивідуальних клітках. Дослідження проводилося у відповідності до етичних норм та рекомендацій щодо гуманізації роботи з лабораторними тваринами, які відображені у «Європейській конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1985). Тварини були розділені на контрольну та експериментальну групи. Контрольним щурам-самицям внутрішньочеревно вводився фізіологічний розчин у кількості 0,5 мл. Експериментальним щурам-самицям один раз на тиждень, два тижні до злучки із самцями та два тижні після, вводився внутрішньочеревно стандартизований сольовий екстракт МП *Hirudo verbana* (Carena, 1820) у кількості 0,5 мл (з кінцевою концентрацією речовини 5 мкг/г тварини), отриманий методом, запропонованим Фроловим А. К. (2013). Дозування антигенів сольового екстракту здійснювали за вмістом білка (концентрацію білка визначали за Лоурі). Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом дотримуючись «Методичних рекомендацій з виведення лабораторних тварин з експерименту». Забір, фіксацію у 10% розчині нейтрального формаліну селезінки та тимусу, виготовлення парафінових блоків з розміщеними в них шматочками органу виконували у відповідності до загальноприйнятих методик. Серійні зрізи всього органу селезінки та тимусу виготовляли за допомогою мікротома Thermo Scientific HM 325 товщиною 4-6 мкм. Для вивчення структурних компонентів селезінки та тимусу гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. Деталі гістологічної будови органів вивчали за допомогою цитоморфологічного комплексу та програмного забезпечення мікроскопу Carl Zeiss Primo Star та цифрової камери Ахіосат, за допомогою яких були зроблені цифрові фотографії мікропрепаратів. У яких, визначали – площу та діаметр лімфоїдних фолікулів в білій пульпі селезінки, площу, діаметр та товщину стінки центральних артерій та кількість лімфоцитів у лімфоїдних фолікулах на одиницю площі (400 мкм²), кількість клітин на одиницю площі в кірковій та мозковій речовинах тимусу. Комп'ютерний програмний аналіз гістологічних препаратів здійснювали за допомогою програми ZEISS ZEN 2011. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми SPSS v.21,0. (IBM SPSS Statistics., USA). Вибіркові параметри, наведені далі в таблиці, мають такі позначення: X – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Вірогідність відмінностей між середніми величинами оцінювали за критерієм Ст'юдента. Різниці вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. При аналізі приплоду у селезінці експериментальної групи тварин на 15 добу у порівнянні з контрольною групою червона і біла пульпа межовані, чітко контуруються лімфоїдні фолікули та їх зони, але разом з тим візуалізується значна кількість мегакаріоцитів, кількість лімфоїдних фолікулів на одиницю площі більша у порівнянні з контрольною групою. На 15 добу у приплоду експериментальної групи показники площі та діаметру лімфоїдних фолікулів селезінки були більші у порівнянні з контролем на 43,8% та 21,9% відповідно (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни лімфоїдних фолікулів селезінки приплоду під впливом сольового екстракту *Hirudo verbana*

Група тварин	Площа лімфоїдного фолікулу, мкм ²	Діаметр лімфоїдного фолікулу, мкм	Кількість лімфоцитів в середньому на 400 мкм ²	Площа центральної артерії мкм ²
Контроль 15 доба	18936,1±2033,8	154,8±14,1	10,97±0,30	819,6±101,0
Експеримент 15 доба	33676,8±13080,3*	198,2±13,7*	11,01±0,49	1442,7±203,1*
Контроль 30 доба	23293,1±2943,1	167,1±12,0	8,41±0,31	479,5±88,9
Експеримент 30 доба	28843,2±2945,3*	199,5±9,0*	13,09±0,30*	728,4±69,5*
Контроль 45 доба	52347,0±2778,7	275,27±11,2	12,29±0,27	1314,2±103,1
Експеримент 45 доба	103160,0±1933,3*	346,3±22,3*	16,19±0,54*	1348,4±111,7
Контроль 60 доба	35263,2±5292,0	238,2±18,3	11,30±0,84	818,0±71,1
Експеримент 60 доба	51886,1±1388,6*	267,1±14,7	12,73±0,83	819,1±83,3
Самиці контроль	15302,3±2353,9	137,8±15,8	16,09±0,54	831,5±165,9
Самиці експеримент	50944,8±16976,2 *	222,1±41,3*	15,88±0,57	2302,4±539,1*

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно із контрольною групою.

Стромальний компонент селезінки представлений ретикулярною тканиною, яка утворена ретикулоендотеліальними, дендритними та інтердигтуючими клітинами.

На 30 добу у дослідній групі щурів зростає кількість макрофагів у білій пульпі, мегакаріюцити переважно розташовані підкапсулярно та у полюсів селезінки близько до білої пульпи (рис.5). Переважає біла пульпа (рис. 4). На 60 добу у дослідній групі тварин крайова зона лімфоїдних фолікулів містить значну кількість макрофагів (бар'єрна функція), великі фолікули зливаються між собою, починають формуватися гермінативні центри у лімфоїдних фолікулах, де візуалізуються фігури мітозу. Дещо меншою стає чисельність мегакаріюцитів порівняно з 15 та 30 добою експерименту, але порівняно з контрольною групою (на 60 добу мегакаріюцитів немає) підкапсулярна частина полюсів селезінки містить групи мегакаріюцитів (рис. 6), що свідчить про гірудологічний вплив на тромбоцитопоез (ініціює тромбоцитарний компонент – гомеостатична дія біологічно активних речовин медичної п'явки).

Аналізуючи білу пульпу селезінки встановлено, що у самок збільшується площа (на 69 %) та діаметр (на 37%) лімфоїдних фолікулів, збільшується площа (на 64%), діаметр (на 46%) та товщина стінки (на 49%) центральних артерій ($p < 0,05$). Таку ж тенденцію змін лімфоїдних фолікулів білої пульпи селезінки відмічали при аналізі їх приплоду табл. 1: на 30 добу експерименту збільшувались площа (на 19,2%), діаметр (на 16,3%) та кількість лімфоцитів на одиницю площі 400 мкм^2 (на 35,8%) (рис. 2) у порівнянні з контрольною групою; на 45 добу продовжується збільшення числових значень показників площі (на 49,2%), діаметру (на 20,5%) та кількості лімфоцитів на одиницю площі лімфоїдних фолікулів (на 24,1%); на 60-ту добу відбувається збільшення площі (на 32,1%) та діаметру (на 10,8%) лімфоїдних фолікулів білої пульпи селезінки відносно відповідних показників контрольної групи тварин табл. 1 ($p < 0,05$).

При дослідженні центральних артерій лімфоїдних фолікулів у самок та їх приплоду на 15 та 30-ту добу спостерігалась тенденція до збільшення товщини стінки та їх площі табл. 1 відповідно ($p < 0,05$), а також збільшення площі периартеріальної зони за рахунок посилення лімфоїдної інфільтрації, що свідчить про активацію диференціювання Т-клітинного пулу лімфоцитів.

Досліджуючи тимус експериментальних тварин приплоду виявили, що кіркова речовина превалює над мозковою. У тимусі приплоду в кірковій та мозковій речовинах часточок збільшується кількість лімфоїдних клітин на одиницю площі ($p < 0,05$), спостерігається переважання кіркової речовини над мозковою, що свідчить про імуностимулюючий вплив БАР *Hirudo verbana* на розвиток лімфоїдних органів (селезінки та тимусу) імунної системи. Досліджуючи кіркову речовину часточок тимусу приплоду визначається достовірне збільшення кількості клітин на одиницю площі: на 15 добу (на 11,0%), на 30 добу - на 11,2%, на 45 добу – на 20,8% та на 60-ту –на 24,4% відповідно. При дослідженні мозкової речовини достовірно збільшується кількість клітин на одиницю площі на 30- ту добу на 5,5% ($p < 0,05$). Тимус експериментальної групи самиць достовірно не відрізнявся від контрольної.

Узагальнюючи результати наших досліджень, нами виявлено, що активно проявлявся стимулюючий ефект на тканину внутрішнього середовища: лімфоїдну, структурною основою якої є ретикулярна тканина, що відноситься до спеціалізованої пухкої сполучної тканини, основні властивості якої: трофічна, захисна, регуляторна, що в повній мірі пояснює в наших дослідах збільшення показників лімфоїдних органів імунної системи (селезінки та тимусу). Отримані дані пояснюють опубліковані нами раніше результати отримані на даній дослідній групі тварин про підвищення маси цих органів та подальше збільшення показників червоної, білої крові та їх функціонального стану. Окрім того, стимуляція морфогенезу призводила до збільшення маси тварини, яка позитивно високо в межах 0,7 - 0,9 корелювала з імунологічними показниками, і зокрема з масою тимусу та селезінки [8]. Причому, збільшення імунологічних показників під впливом БАР МП відбувалась в фізіологічних межах норми реакції генотипу щурів без тератогенних ознак. Пролонгована стимуляція морфогенезу у дослідній групі щурів, окрім можливого депонування в тканинах залишкових кількостей сольового екстракту п'явки, більш ймовірно, обумовлено основною функцією імунної системи - контроль та регуляції гістогенезу усіх тканин, яка за багатьма дослідниками називається морфогенетичною функцією імунної системи. Наприклад, при переносі сепарованих Т- та В-лімфоцитів крові від оперованих щурів (резекція печінки) інтактним тваринам індукував у останніх в печінці репаративні процеси. А при штучному інгібуванні стадій гістогенезу у оперованих щурів, виділені їх Т- та В-лімфоцити у інтактних тварин індукували морфогенез саме з інгібуючої стадії гістогенезу [1, 9].

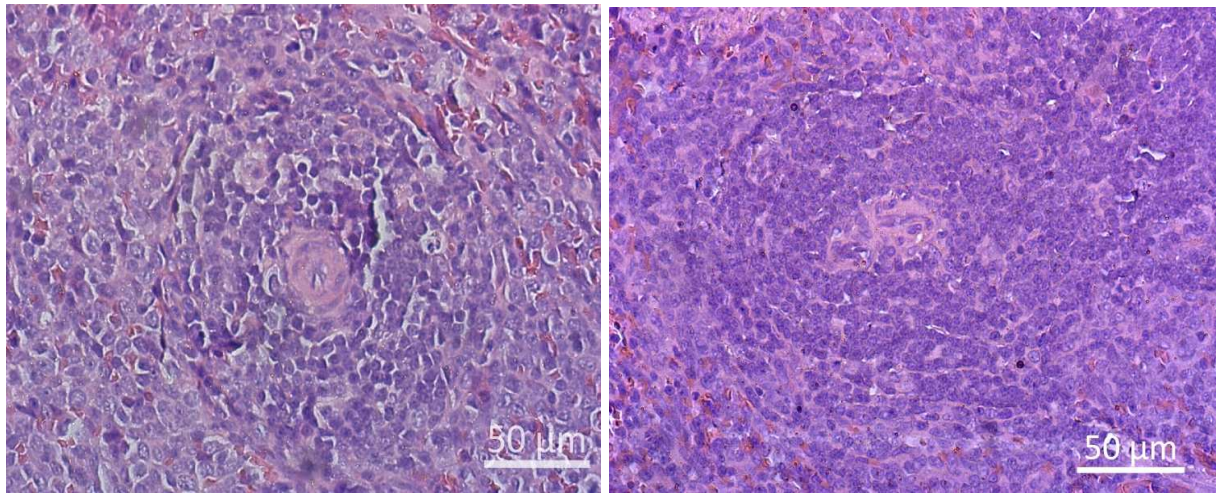


Рис. 1. Лімфоїдний фолікул білої пульпи селезінки приплоду контрольної (А) та експериментальної (Б) групи. Вік: 30 діб. Забарвлення: гематоксилін та еозин.

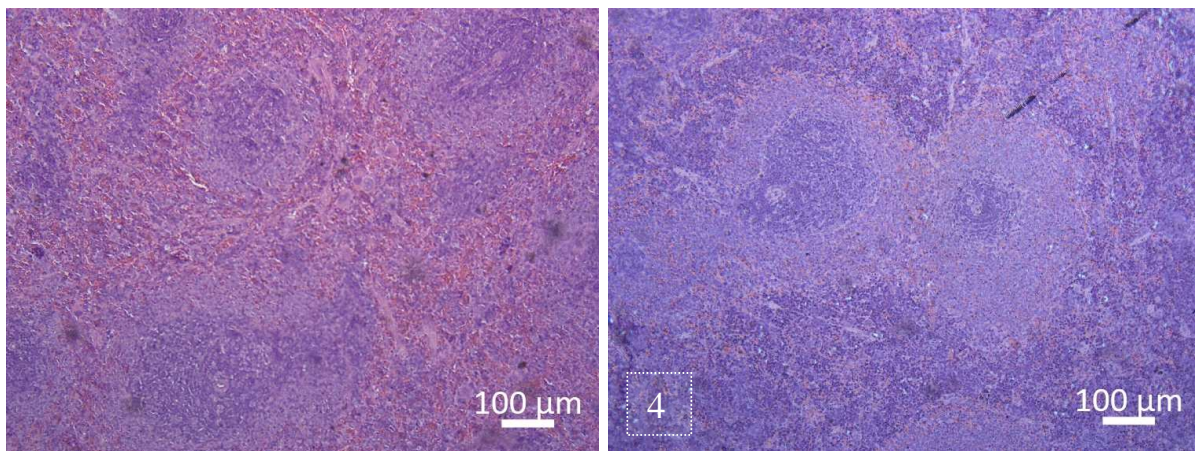


Рис.2. Біла та червона пульпа селезінки приплоду контрольної (А) та експериментальної (Б) групи. Вік: 30 діб. Забарвлення: гематоксилін та еозин.

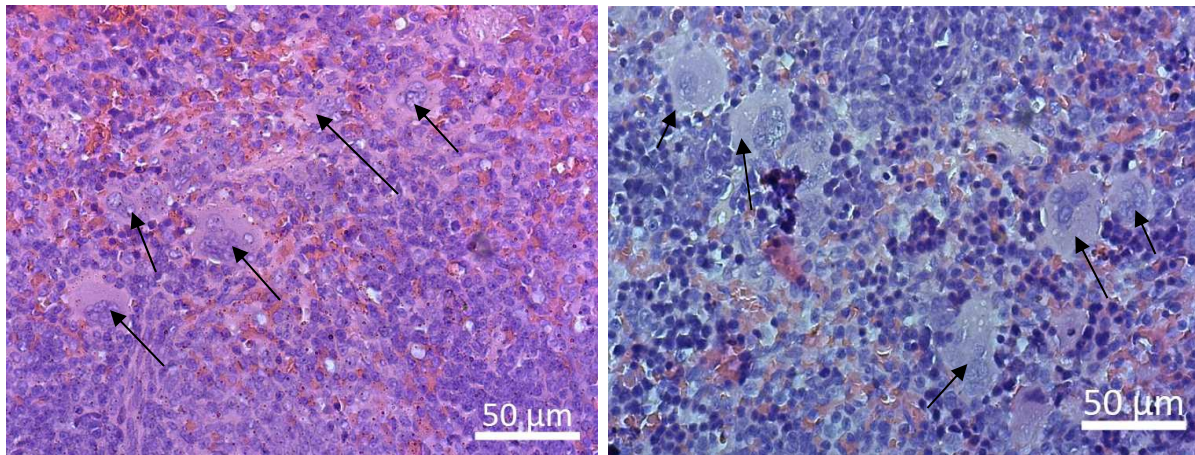


Рис.3. Мегакаріоцити селезінки приплоду експериментальної групи тварин. Вік: 30 діб (А), 60 діб (Б). Забарвлення: гематоксилін та еозин.

Участь морфогенетичної функції у фізіологічних та репаративних гістогенезах підтверджується також, даними імуноморфологів [1, 3]. Вони виявили, що при різних функціональних навантаженнях на орган, або при порушенні в ньому структурного гомеостазу не інфекційними факторами відбувається інфільтрація даного органу лімфоцитами, які стимулювали репаративні процеси. Таким чином, нами підтверджена активна участь імунної системи в регуляції гістогенетичних процесів, в тому числі, на ранніх етапах онтогенезу. При чому в перше виявлено імуномодельючий вплив сольового екстракту БАР МП, який може бути придатний в ветеринарії та тваринництві, а в майбутньому, і у людини.

Нісумок

У селезінці експериментальної групи тварин переважає біла пульпа, що свідчить про імуностимулюючий вплив БАР *Hirudo verbana* на кровотворний імунний орган (селезінку). Велика кількість мегакаріоцитів, особливо у підкапсулярній частині полюсів селезінки свідчить про гірудологічний вплив БАР на тромбоцитопоез, що доводить стимулюючий ефект гомеостатичної дії біологічно активних речовин медичної п'явки. При аналізі тимусу експериментальних тварин виявлені зміни доводять імуностимулюючий вплив БАР *Hirudo verbana* на процес антигеннезалежного диференціювання Т-клітинного пулу лімфоцитів у приплоду. Таким чином, перспективним є дослідження інших центральних та периферійних органів імунної системи за впливу солевого екстракту БАР *Hirudo verbana*.

Список літератури

1. Babayeva AG. Yeshche raz o morfogeneticheskoy, ili stroitelnoy funktsii limfotsitov. Byulleten Rossiyskoy Akademii Yestestvennykh nauk. 2010; 4: 70–74. [in Russian]
2. Bobryshev IV. Morfofunktsionalnyye osobennosti timusa u raznovozrastnykh kryss posle eksperimentalnoy immunosupressii. Byulleten Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2014;13(1): 48-55. [in Russian]
3. Voloshyn NA, Talanova OS. Vplyv prenatalnoho antyhennoho navantazhennya na formuvannya masy shchuriv liniyi Vistar. Svit Biolohiyi i Medytsyny. 2011 Jun 3;2(88): 32–33. [in Ukrainian]
4. Dunaievskaya OF. Morfolohichni zminy selezinky pid vplyvom riznykh faktoriv. Zhurnal Kharkivskoho natsionalnoho universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya Biolohiya. 2016; 27: 106–124. [in Ukrainian]
5. Poroyskaya AV. Morfofunktsionalnyye kharakteristiki selezenki i limfateskikh uzlov pri eksperimentalnom razmnozhenii likhoradki Zapadnogo Nila. Volgograd, Volgogradskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2004. 24c. [in Russian]
6. Struchko GU, Merkulova LM, Moskvichev EB, Kostrova OY, Mikhailova MN. Morfologicheskiye izmeneniya vilochkovoy zhelezy posle primeneniya polioksidoniya. Fundament. issledovan. 2012; 5(1): 197–202. [in Russian]
9. Babaeva AG, Gevorkyan NM, Tishevskaya NV, Komarova IA. Effects of preparations of total RNA from lymphoid cells of rat spleen on in vitro erythropoiesis. Clinical and Experimental Morphology 2014; 4(12): 35–39.
10. Tagesu A Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. MOJ Drug Development and Therapy. 2018; 2 (6): 235-242.

Реферати

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
СЕЛЕЗЕНКИ И ТИМУСА КРЫС
ПОСЛЕ ВЛИЯНИЯ СОЛЕВОГО ЭКСТРАКТА
HIRUDO VERBANA**

**Аминов Р.Ф., Сыртцов В.К., Федосеева О.В.,
Фролов А.К.**

Работа была направлена на изучение морфологических показателей селезенки и тимуса крыс на фоне воздействия солевого экстракта *Hirudo verbana*. Самкам внутрибрюшинно вводился стандартизированный солевой экстракт из тел медицинской пиявки, два раза до случки с самцами и два раза после. После вскармливания потомства на 60 сутки после последнего введения вещества, самок и их приплод в динамике на 15, 30, 45 и 60-е сутки постэмбрионального онтогенеза подвергали декапитации. Анализировали белую пульпу селезенки - площадь и диаметр лимфоидных фолликулов, центральных артерий и количество лимфоцитов на единицу площади (400 мкм²) в лимфоидных фолликулах, в тимусе - количество лимфоцитов на единицу площади, как в корковом, так и мозговом веществе. Под влиянием биологически активных веществ медицинской пиявки в белой пульпе селезенки увеличиваются размеры лимфоидных фолликулов и центральных артерий, повышается количество лимфоцитов на единицу площади (400 мкм²) лимфоидного фолликула, а в тимусе приплода, как в корковом, так и мозговом веществе увеличивается количество клеток на единицу площади (400 мкм²), наблюдается преобладание коркового над мозговым веществом. В результате исследования выявлено стимулирующее влияние солевого экстракта *Hirudo verbana* на иммуногенез в центральных и периферических органах иммунной системы.

Ключевые слова: медицинская пиявка, гирудотерапия, морфогенез, селезенка, тимус.

Статья надійшла 16.04.2019 р.

**MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF SPLEEN
AND THYMUS OF THE RATS AFTER
THE INFLUENCE OF SALINE EXTRACTS
HIRUDO VERBANA**

**Aminov R.F., Syrtsov V.K., Fedosieieva O.V.,
Frolov A.K.**

The work was aimed to investigate the morphological parameters of the spleen and thymus of rats against the background of influence of the saline extract *Hirudo verbana*. The females were injected intraperitoneally with a standardized salt extract from the bodies of a medical leech, twice before mating with males and twice after it. On feeding offspring, on the 60th day after the last injection of the substance, the females and their offspring in dynamics, on the 15th, 30th, 45th and 60th days of the postembryonic ontogenesis, were decapitated. We analyzed the white pulp of the spleen - the area and diameter of lymphoid follicles, central arteries and the number of lymphocytes per a unit area (400 μm²) in lymphoid follicles, in the thymus - the number of lymphocytes per a unit area, both in the cortical and brain substance. Under the influence of biologically active substances of a medicinal leech in the white pulp of the spleen, the sizes of lymphoid follicles and central arteries grow, the number of lymphocytes per a unit area (400 μm²) of the lymphoid follicle grows, and the number of cells per a unit area in the thymus of the offspring, both in the cortical and brain substance areas (400 μm²), there is a predominance of cortical substance over the medulla. The study revealed a stimulating effect of the *Hirudo verbana* salt extract on immunogenesis in the central and peripheral organs of the immune system.

Key words: medicinal leech, hirudotherapy, morphogenesis, spleen, thymus.

Рецензент Шепітько В.І.