

## МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПЕРЕДЗАБІЙНОГО СТРЕСУ ТА ВИКОРИСТАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

**С.С. Грабовський**

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*

### Реферат

**Мета.** Досліджували морфометричні показники селезінки щурів за умов передзабійного стресу на тлі використання біологічно активних речовин рослинного і тваринного походження.

**Матеріал і методи.** Як антистресори та імуномодулятори у передзабійний період (за п'ять днів до забою) додатково до основного раціону аерозольним методом вводили екстракт селезінки, екстракти ехінацеї та лимоннику (70° спиртові розчини), пророщене зерно. Тваринам контрольної групи таким же чином додавали до корму 70° розчин етанолу в аналогічному об'ємі. Дослід тривав п'ять днів в умовах віварію, лабораторних тварин брали з кліток по чергово, зважували і декапітували під етерним наркозом. Математичну обробку результатів досліджень опрацьовували статистично за допомогою пакету програм Statistica 6.0 і Microsoft Excel for Windows XP. Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

**Результати й обговорення.** За умов передзабійного стресу спостерігали деякі зміни у морфоструктурі тканини селезінки лабораторних тварин. При гістологічному дослідженні селезінки щурів усіх дослідних груп встановлено чіткий поділ її на червону та білу пульпу. Червона пульпа складала основну масу паренхіми органу і представлена сіткою ретикулярних волокон, що переходять у колагенові, волокна трабекул і капсули. Ретикулярна сітка пронизана венозними синусами, у петлях яких розташовані еритроцити, лімфоцити, клітини плазматичного ряду, лейкоцити та інші елементи крові. У тварин, яким додатково до раціону вносили екстракт селезінки (I дослідна група) була сформована найбільша кількість лімфатичних вузлів з реактивними центрами та встановлено зміни їх середньої площі порівняно з контролем.

**Ключові слова:** щури, селезінка, передзабійний стрес, екстракти селезінки, ехінацеї та лимоннику китайського, пророщене зерно

### Abstract

A MORPHOMETRIC CHARACTERISTIC OF RATS SPLEEN AT PRE-SLAUGHTER STRESS UNDER THE USE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

S.S. GRABOVSKYI

The S.Z. Gzhytskyj National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies in Lviv

**Aim.** Studies of the morphometric parameters of rat spleen under pre-slaughter stress conditions using biologically active substances of plant and animal origin were carried out.

**Material and Methods.** The spleen extract, the Echinacea and Chinese lemon extracts (70° alcohol solutions), and the sprouted grains were added to the diet of the rats of all experimental groups by aerosol method as antistressors and immunomodulators in pre-slaughter period (five days before slaughter). Only 70° alcohol solution in the same volume and the same method was added to the diet of the rats of the control group five days before slaughter. The experiment continued for five days in the vivarium; laboratory animals were taken from the cage in turn, weighed and decapitated under ether anaesthesia. Research results were processed statistically using the software package Statistica 6.0 and Microsoft Excel for Windows XP. Probability differences were assessed by Student t-test.

**Results and Discussion.** Some changes in the morphological structure of the spleen tissue were observed at pre-slaughter stress in laboratory animals. The histological investigation of the rat spleen of the experimental groups established a distinct fission of the red and white pulp. The red pulp formed the bulk of the organ's parenchyma and presented as a net of reticular fibers passing into the collagen fibers, fibers trabeculae and capsules. Reticular mesh is permeated by venous sinuses, with erythrocytes, lymphocytes, plasma cells, white blood cells and other blood components located in the loops. The largest number of lymphatic nodes with react centers were formed in laboratory animals additionally fed with spleen extract (I experimental group); changes of their average area were found, compared to control.

**Conclusions.** The results obtained in model experiments on laboratory animals in the vivarium can be used in research on agricultural animals to prevent the effect of their pre-slaughter stress on the quality of meat products.

**Key words:** rats, spleen, pre-slaughter stress, spleen extract, echinacea and Chinese lemon extracts, sprouted grains

### Вступ

Відомо, що селезінка, найбільша серед вторинних лімфоїдних органів, є у всіх хребетних, її паренхіма представлена двома складовими: червоною та білою пульпою, які відрізняються за кольором на зрізі органу та на гістологічних препаратах. Біла пульпа селезінки має високоорганізовану акумуляцію Т- і В-лімфоцитів, що оточують центральні артерії, у той час як червона пульпа складається з венозних синусів та селезінкових тяжів. Структурні розбіжності у будові селезінки людини і тварин пов'язані з видовими анатомічними та фізіологічними особливостями.

На основі гістологічної та морфометричної оцінки функціональних [1] зон селезінки виділяють чотири групи тварин: 1) з гарно вираженою депонуючою функцією селезінки (кінь, собака, кішка), 2) із "селезінкою захисту", у яких переважною функцією органу є імунна та бактерицидна (миші, щури), 3) деякі ссавці (людина, велика рогата худоба), в яких гістоархітектоніка селезінки зумовлює як депонуючу, так і функцію захисту однаковою мірою, що дозволяє віднести її до "змішаного варіанту", 4) тварини, у яких селезінка слабо розвинута і функціонально мало активна (кролик, морська свинка) [2].

Використання різних імуномодулюючих та антистресових препаратів потребує вивчення їх впливу на організм і безпосередньої дії на активізацію адаптаційних властивостей органів імунного захисту. У літературі є дослідження, присвячені вивченню впливу стресу та його корекція біологічно активними речовинами на морфологічні зміни у селезінці [3-5]. Показано важливу роль поліамінів (путресцину, сперміну та спермідину) в активації імунологічних властивостей організму [6-8].

Незважаючи на широке застосування імуномодулюючих препаратів, які стимулюють резистентність організму, ще недостатньо досліджено вплив передзабійного стресу на морфометричні характеристики селезінки тварин.

### Матеріал і методи

Дослідження проводили на білих статевозрілих самках лабораторних щурів лінії Вістар масою тіла 180-220 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з 12-годинним режимом освітлення темнота/світло за температури 20-22°C і необмеженим доступом до питної води та стандартного брикетованого комбікорму для лабораторних тварин. Для досліджень було сформовано чотири групи (три дослідні - I, II і III та контрольну) по п'ять щурів у кожній. Як антистресори й імуномодулятори у передзабійний період (за п'ять днів до забою) використовували екстракт селезінки (I), екстракти ехінацеї та лимоннику (II), пророщене зерно (III). Екстракти у вигляді 70° спиртового розчину наносили на корм аерозольним розпиленням в об'ємі 0,6 мл/тварину. Щурам контрольної групи таким же чином додавали до корму 70° розчин етанолу в аналогічному об'ємі.

Тваринам усіх груп додатково до стандартного корму додавали зерно (10 г/тварину). Поїдання корму контролювали щоденно. У кінці досліду всіх тварин декапітували по чергово під етерним наркозом.

Під час експерименту біоетичні норми згідно з Європейською конвенцією "Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей" (Страсбург, 1986 р.) і "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та дотримання принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [9], були збережені.

Для виконання морфологічних досліджень [10] виділяли фрагменти селезінки, фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Після цього зневоднювали у низці розчинів етилового спирту з висхідними концентраціями (70°, 80°, 90°, 96°) і заливали парафіном. На санному мікромомі виготовляли зрізи завтовшки від 5 до 15 мкм, які фарбували гематоксиліном і еозином. Світлову мікроскопію і мікрофотографування гістопрепаратів здійснювали за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41 та фотокамери OLYMPUS C-5050. Морфометрію на тканинному рівні проводили з використанням програми DP-SOFT для мікроскопа OLYMPUS CX 41.

Математичну обробку результатів досліджень опрацьовували статистично за допомогою пакету програм Statistica 6.0 і Microsoft Excel for Windows XP. Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

### Результати й обговорення

Гістологічним дослідженням селезінки щурів усіх дослідних груп встановлено чіткий поділ її на червону та білу пульпу. Червона пульпа складала основну масу паренхіми органу і представлена сіткою ретикулярних волокон, що переходять у колагенові, волокна трабекул і капсули. Ретикулярна сітка пронизана венозними синусами, у петлях яких розташовані еритроцити, лімфоцити, клітини плазматичного ряду, лейкоцити та інші елементи крові.

При мікроскопічному дослідженні селезінки щурів I групи виявляли, що основну площу зрізів займала червона пульпа, у масиві якої ви-

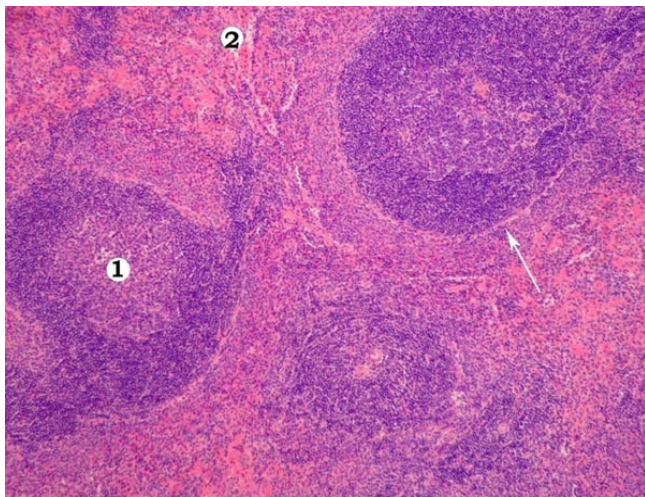


Рис. 1

Селезінка щурів I групи. Лімфоїдний вузлик (1), червона пульпа (2), маргінальна зона (показана стрілкою). Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 10

різнялась рівномірно розміщена тканина білої пульпи у формі лімфатичних вузликів навколо центральних вен і лімфоїдних скупчень (рис. 1). У лімфатичних вузликах чітко визначали вузьку периартеріальну зону, яка переходила у ширшу й розширену гермінативну. Мантійна зона була обмежена маргінальною, що межує з лімфоїдними вузликами і червоною пульпою. Лімфатичні вузлики чітко контуровані на тлі червоної пульпи.

У тварин I групи сформована найбільша кількість лімфатичних вузлів з реактивними центрами. Співвідношення загальної кількості лімфатичних вузлів селезінки до лімфатичних вузлів із реактивними центрами становило, відповідно, у I групі 1:0,8; II групі - 1:0,4; III групі - 1:0,36; і IV групі - 1:0,32 (рис. 2). У щурів, які додатково з кормом отримували екстракт селезінки (I дослідна група), рівень лімфатичних вузлів із реактивними центрами був у два рази більший ( $P < 0,05$ ) порівняно з тваринами контрольної групи (IV) (рис. 2). Відомо, що поява реактивних центрів у лімфатичних вузлах селезінки є реакцією на антигенну стимуляцію.

У червоній пульпі селезінки щурів I та II груп виявляли значну кількість мегакаріоцитів, що, ймовірно, можна пов'язати з перебудовою імунної системи у відповідь на її активацію біологічно активними речовинами введеного екстракту селезінки та ехінацеї (рис. 3).

Разом з тим, слід відмітити, що у селезінці щурів I та II груп периартеріальна зона, яка представлена скупченням Т-лімфоцитів навколо ар-

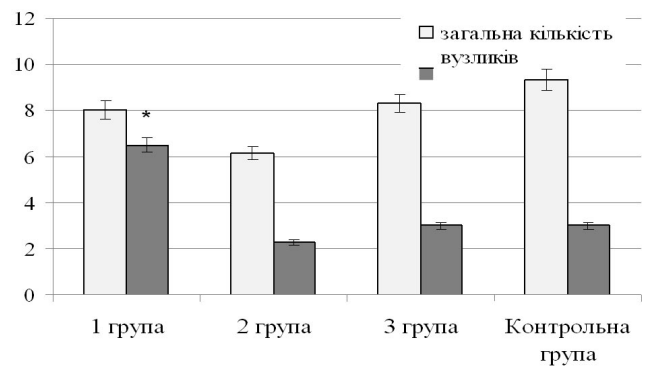


Рис. 2

Співвідношення загальної кількості лімфатичних вузлів селезінки до лімфатичних вузлів із реактивними центрами, ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

терії лімфатичного вузлика, достатньо широка, збагачена інтердигтуючими клітинами - макрофагами, здатними фіксувати на своїй поверхні комплекси антитіл з антигенами і викликати проліферацію та дозрівання Т-лімфоцитів. Темна мантійна зона утворена з компактно розміщених малих В-лімфоцитів і незначної кількості Т-лімфоцитів, плазмочитів та макрофагів (рис. 4, 6).

Аналізуючи морфометричні показники селезінки щурів слід відзначити, що окрім збільшення загальної кількості лімфатичних вузлів селезінки, встановлено також і зміни їх середньої площі. Так у щурів I групи середня площа лімфатичних вузлів селезінки складала, відповідно, 289,12 мкм<sup>2</sup>, що два з половиною рази більше ( $P < 0,05$ ) порівняно з тваринами контрольної групи; II групи - 255,35; III групи - 187,27; і IV групи - 187,05 мкм<sup>2</sup> відповідно (рис. 5).

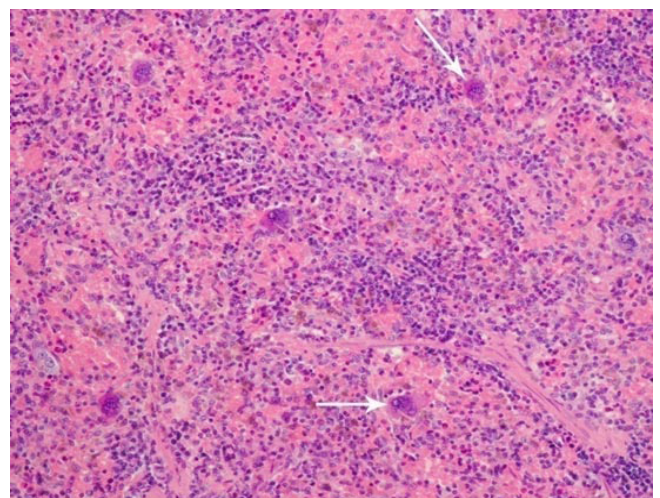


Рис. 3

Селезінка щурів I групи. Мегакаріоцити у червоній пульпі (показано стрілками). Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 20

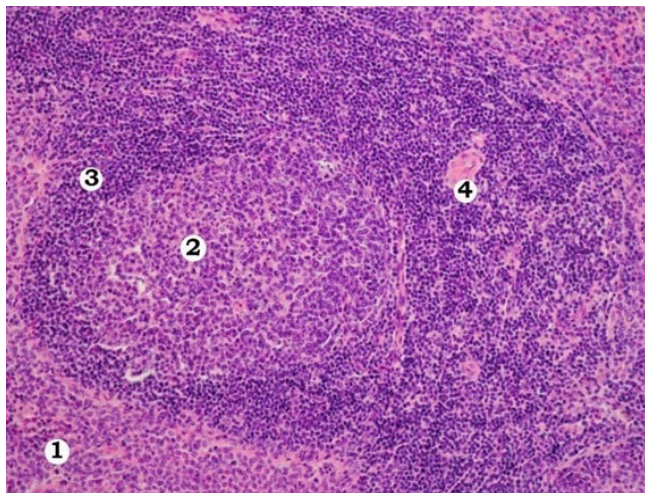


Рис. 4

Селезінка щурів I групи. Червона пульпа (1), реактивний центр лімфатичного вузла (2), мантійна зона (3), артерія лімфатичного вузла (4). Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 20

Якщо за мікроскопічного дослідження селезінки щурів контрольної групи виглядала збереженою, то за морфометричними показниками площа білої пульпи була значно меншою. Лімфоїдні вузлики втрачали чітко виражену структуру, пульпарні артеріоли потовщені (рис. 7).

Проведені дослідження показали, що поліаміни на основі екстракту селезінки впливають на величину лімфоїдних вузликів та на формування лімфатичних вузлів з реактивними центрами. У червоній пульпі селезінки було виявлено значну кількість мегакаріоцитів, що, ймовірно, можна пов'язати з перебудовою імунної системи

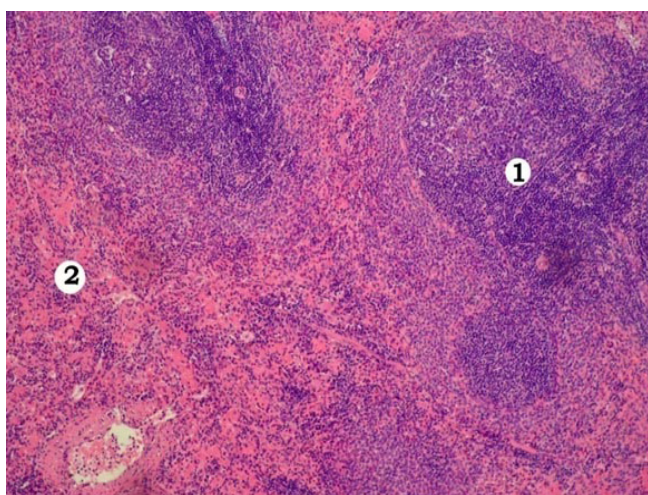


Рис. 6

Селезінка щурів 2 групи. Сформовані лімфатичні вузлики з реактивними центрами (1), червона пульпа (2). Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 10

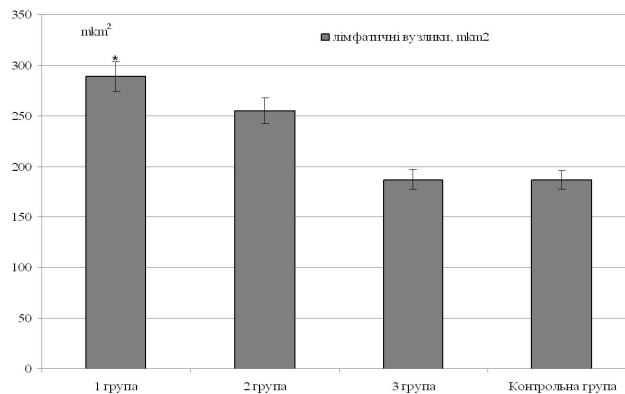


Рис. 5

Середня площа лімфатичних вузлів селезінки, ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

при активації її біологічно активними речовинами з екстракту селезінки та ехінацеї.

Периартеріальна зона тварин I дослідної групи була збагачена інтердигітуючими клітинами - макрофагами.

Використання препарату екстракту селезінки на фоні стресу сприяло збільшенню площі лімфоїдних вузликів у щурів I групи та площі білої пульпи селезінки і тим самим активізувало механізми адаптації організму тварин, в порівнянні з контрольною групою щурів.

Підтвердженням позитивного впливу на зміни морфофункціональної структури селезінки можуть служити наші попередні дослідження, де показано зменшення концентрації кортизолу та підвищення неспецифічної резистентності крові щурів за дії біологічно активних речовин з екстракту селезінки [11].

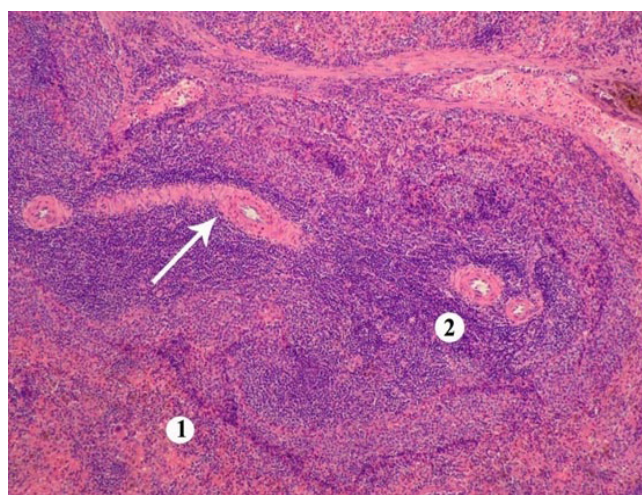


Рис. 7

Селезінка щурів контрольна група. Потовщення пульпарних артеріол. Червона пульпа (1), біла пульпа (лімфоїдний вузлик (2)). Гематоксилін та еозин. Ок.10, об.10

## Висновки

1. У тварин, яким додатково до раціону вносили екстракт селезінки була сформована найбільша кількість лімфатичних вузлів з реактивними центрами та встановлено збільшення їх середньої площі вузлів.

2. Поліаміни на основі екстракту селезінки впливають на величину лімфоїдних вузликів та на формування лімфатичних вузлів з реактивними центрами.

## Література

1. Fedorovskaya NS, Diakonov DA, Andreeva SD. [Histological and morphometric features of the spleen in humans and mammals]. *International journal of experimental education*. 2012;(1):39-40.
2. Voloshyn V. M. Budova selezinky. *Morfolohiya*. 2014, T.8, №1, S. 8-15. (Ukrainian). (Волошин В. М. Будова селезінки. *Морфологія*. 2014, Т.8, №1, С. 8-15.).
3. Vishnevskaja T. Ja., Abramova L. L. Morfologicheskie osnovy reaktivnosti selezenki krolikov v uslovijah stressa i ego immunokorrekcii. *Visnik agrarnoi nauki Prichornomor'ja*. 2013, Vip. 4, T. 2, Ch. 1, S. 31-35. (Russian). (Вишневская Т.Я., Абрамова Л.Л. Морфологические основы реактивности селезенки кроликов в условиях стресса и его иммунокоррекции. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2013, Вип. 4, Т. 2, Ч. 1, С. 31-35.).
4. Gumen A. V., Shanin S. N., Kozinec I. A., Malinin V. V., Rybakina E. G. Citotoksicheskaja aktivnost' natural'nyh killernyh kletok selezenki krysa pri stressе i ee korrekciya korotkimi immunomodulirujushhimi peptidami. *Citokiny i vospalenie*. 2006, 5(2), 37-41. (Russian). (Гумен А. В., Шанин С. Н., Козинец И. А., Малинин В. В., Рыбакина Е. Г. Цитотоксическая активность натуральных киллерных клеток селезенки крыс при стрессе и ее коррекция короткими иммуномодулирующими пептидами. *Цитокины и воспаление*. 2006, 5(2), 37-41.).
5. Voloshyn M. A., Kucherenko L. I., Hryhor'yeva E. A. Morfolohiya limfoydnykh orhaniv v umovakh immobilizatsiynoho stressu i pislya poperedn'oho vvedennya tiotsetamu. *Farmatsevychnyy chasopys*. 2014, № 3, S.152-157 (Ukrainian). (Волошин М. А., Кучеренко Л. И., Григор'ева Е. А. Морфология лимфоидных органов в условиях иммобилизационного стрессу і після попереднього введення тіоцетаму. *Фармацевтичний часопис*. 2014, № 3, С.152-157).
6. Gomez-Gallego C., Frias R., Perez-Martinez G., Bernal M.J., Periago M.J., Salminen S., Collado M.C. Polyamine supplementation in infant formula: Influence on lymphocyte populations and immune system-related gene expression in a Balb/cOlaHsd mouse model. *Food Research International*, 2014, 59, 8-15.
7. Nishimura K., Kashiwagi S.K., Igarashi K. Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *Journal of Biochemistry*. 2006, Vol. 139, 81-90.
8. Bjelakovic G., Stojanovic I., Stoimenov T.J., Pavlovic D., Kocic G., Rossi S., Bjelakovic L. Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis. *Amino acids*. 2010, 39(1), 29-43.
9. Official Journal of the European Union L276/33. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609/EC. 20.10.2010.
10. Merkulov, G.A. (1969). *Pathology Technique Course*. Leningrad: Medicine. (Russian). (Меркулов Г.А. Курс патологической техники. Ленинград : Медицина, 1969, 423 с.).
11. Grabovskiy S.S. Vplyv imunomodulyatoriv pryrodnoho pokhodzhennya na pokaznyky klitynnoho imunitetu i riven' kortyzolu v krovi shchuriv za umov stressu. *Biologichni Studiyi*. 2014, T. 8, №1, S. 93-102. (Ukrainian). (Грабовський С.С. Вплив імуномодуляторів природного походження на показники клітинного імунітету і рівень кортизолу в крові щурів за умов стресу. *Біологічні Студії*. 2014, Т. 8, № 1, С. 93-102).