

УДК 591.441:615.357
© Стаценко Е.А., 2009

МОРФОГЕНЕЗ БЕЛОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ИМ БИСФОСФОНАТА «ЗОМЕТА»

Стаценко Е.А.

Луганский государственный медицинский университет.

Стаценко Е.А. Морфогенез белой пульпы селезенки половозрелых крыс после введения им бисфосфоната «Зомета» // Український морфологічний альманах. – 2009. - Том 7, № 4. – С. 114-117.

Была исследована белая пульпа селезенки половозрелых крыс в различные сроки эксперимента после введения им бисфосфоната «Зомета». Планируется произвести исследование белой пульпы селезенки половозрелых крыс после введения им глюкокортикоидов.

Ключевые слова: селезенка, лимфоциты, морфогенез.

Стаценко О.А. Морфогенез білої пульпи селезінки статевозрілих шурів після введення бісфосфонату «Зомета» // Український морфологічний альманах. – 2009. - Том 7, № 4. – С. 114-117.

Була досліджена біла пульпа селезінки статевозрілих шурів у різні терміни есперименту після введення їм бісфосфонату «Зомета». Планується проведення дослідження білої пульпи селезінки статевозрілих шурів після введення їм глюкокортикоїдів.

Ключові слова: селезінка, лімфоцити, морфогенез.

Statsenko E.A. A white pulp of puberate rats spleen morphogenesis after injecting them by bisfosfonate «Zometa» // Український морфологічний альманах. – 2009. - Том 7, № 4. – С. 114-117.

The white pulp of a spleen of puberate rats was examined by us in different periods of the experiment after injecting them by bisfosfonate «Zometa». It is planned to make a research of puberate rats spleen morphogenesis while injecting them by glucocorticoids

Key words: spleen, lymphocytes, morphogenesis

Основными современными патогенетическими средствами для лечения остеопороза являются наряду с другими препаратами бисфосфонаты [1,4]. Этот класс лекарственных препаратов применяют также для лечения костных метастазов при различных онкологических заболеваниях, так как недавние клинические испытания показали, что они также обладают противоопухолевой активностью и усиливают иммунные свойства человеческого организма. Появление бисфосфонатов в клинике значительно расширяет возможности врача в терапии больных с костными изменениями, облегчает участь пациентов, значительно улучшает их качество жизни [1]. Для оценки состояния селезенки как вторичного органа иммуногенеза в условиях введения животным бисфосфоната «Зомета», рациональным является исследование морфологических показателей белой пульпы селезенки белых крыс.

Связь работы с научными программами, планами, темами: работа является фрагментом НИР Луганского государственного медицинского университета «Особенности морфогенезу кісткової, імунної та ендокринної систем під впливом екологічних чинників» (державний реєстраційний номер 0103U006652). **Целью** настоящей работы является изучение гистологических срезов селезенки крыс-самцов в условиях введения им бисфосфоната «Зомета» на светооптическом уровне.

Материалы и методы. Объектом исследования послужили 12 беспородных белых крыс-самцов репродуктивного возраста со средней массой 136,25±0,11г. Животные получали бисфосфонат пятого поколения - золедронат - лиофилизат золедроновой кислоты («Зомета», производства Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland, регистрационный номер в Украине

P.06.01./03.164, серийный номер 993 931,4-983/20 es), в дозе 0,362 мг/кг внутривентриально 1 раз в 30 дней. Крыс выводили из эксперимента на 7, 30, 90 сутки в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных». Особого интереса представлял срок «реадаптации» когда крысы из 90 дней исследования лишь 30 дней находились под воздействием препарата. После извлечения селезенки из брюшной полости её фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. После этого препараты промывали в проточной воде в течение часа. Проводку материала осуществляли по стандартной методике, которая включает в себя дегидратацию в спиртах восходящей концентрации и толуоле, затем проводилась заливка образцов в парафиновые блоки. Далее на микротоме MC-2 изготавливали парафиновые срезы толщиной 3-4 мкм, обзорные срезы окрашивали гематоксилин-эозином, для выявления лимфоцитарного звена использовалась окраска азур-П-эозин.

Готовые гистологические препараты исследовали и фотографировали на цифровом морфометрическом комплексе, в состав которого входят; бинокулярный микроскоп Olympus BX-41, цифровой фотоаппарат Olympus C50502 с пятимегапиксельной матрицей и персональный компьютер на базе процессора Athlon XP 2200+Mh DDR RAM 512MB, HDD 128GB, video GeForce FX5200 128MB. С помощью комплекса получали высококачественные цифровые фотографии в нескольких режимах увеличения; при объективе 4x и 10x для исследования макроструктуры селезенки и при объективе 40x для исследования микроструктуры органа.

Анализ цифровых данных проводили с помощью компьютерной программы для морфомет-

рических исследований «Morpholog» («Свідомство про рєсстрацію авторського права №9604», автори; В.В. Овчаренко, В.В. Маврич, 2004), усовершенствованной для изучения селезенки. Полученные данные обчисляли с помощью пакета статистических программ достоверной считали вероятность ошибки менее 5% ($p < 0,05$). При морфометрии селезенки обрабатывались следующие параметры: общая площадь среза, площадь белой пульпы, периартериальных лимфоидных муфт, общую площадь и количество лимфатических узелков, их герминативных центров, общую площадь периартериальной, мантийной и краевой зон. Вычисляли процентное отношение белой пульпы и лимфатических узелков к общей площади среза.

Результаты и их обсуждение. Гистологическая структура селезенки половозрелых белых крыс которым вводился бисфосфонат «Зомета» представлена белой и красной пульпой, лимфатическими узелками, периартериальными лимфоидными муфтами, синусоидными капиллярами, трабекулами и пульпарными тяжами. После введения бисфосфоната «Зомета» у подопытных животных выявлены отличия, которые проявляются в изменении различных структур селезенки. Гистологические срезы селезенки были исследованы в трех увеличениях: 40х, 100х, 400х (рис. 1-4). Белая пульпа селезенки данной группы животных представлена лимфатическими узелками и периартериальными лимфоидными муфтами (рис. 5). Лимфатические узелки являются В-зависимой зоной, они могут быть с герминативными центрами или без

них, а также состоять из мантийной и краевой зон (рис. 3). Периартериальные лимфоидные муфты, находящиеся вокруг пульпарных артерий являются Т-зависимой зоной лимфоидной ткани селезенки

На срезах селезенки от крыс получавших «Зомету» общая площадь сечения белой пульпы от общей площади среза препарата варьировала от 17,89% на 7 сутки до 24,09% к 30 суткам исследования, и к 90 суткам исследования имела тенденцию к снижению до 21,39%, что превышает значения полученные от контрольных животных. Общая площадь белой пульпы на 7 сутки исследования составляла $1557694 \pm 82999,37$ мкм², к 30 суткам показатель составлял $1880528 \pm 69942,93$ мкм² (рис. 2) и к 90 суткам показатель общей площади белой пульпы достигал $1973751 \pm 14840,99$ мкм² (рис. 4). В сравнении с интактными животными выявлено повышение показателя общей площади белой пульпы селезенки крыс данной серии на протяжении всего исследования на (7, 30, 90) сутки на 3,09%, 5,68%, 8,52%. В серии «реадаптации», когда введение «Зометы» прекращалось после 30 дня, общая площадь белой пульпы селезенки к 90 дню становилась выше контрольной на 3,74 % и была равна $1887306 \pm 10954,14$ мкм² (рис. 3).

Лимфатические узелки белой пульпы селезенки у животных получавших «Зомету» крупные, имеют преимущественно округлую форму. Среди них встречаются скопления, состоящие из 3-4 узелков. Размеры их превышают контрольные значения (рис. 5).

Таблица 1. Показатели белой пульпы экспериментальных и контрольных животных.

Влияние	Показатель	Сроки наблюдений			
		7 суток	30 суток	90 суток	30+60 суток
«Зомета»	Общая площадь белой пульпы, мкм ²	1557694±82999,37	1880528±69942,93	1973751±14840,99	1887306±10954,14
Контроль	Общая площадь белой пульпы, мкм ²	1528389±26893,63	1779306±13278,38	1819111±15572,55	1819111±15572,55
«Зомета»	Общая площадь лимфатич. узелков, мкм ²	944416±51267,7	978694±50940,73	1048972±55489,87	987333±44157,82
Контроль	Общая площадь лимфатич. узелков, мкм ²	903888±61848,17	909388±19671,2	969638±55199,7	969638±55199,7
«Зомета»	Общая площадь периартер. зоны, мкм ²	8683,05±187,6	9131,6±182,6	9306,6±198,5	9249,1±195,1
Контроль	Общая площадь периартер. зоны, мкм ²	8665,5±345,7	9052,7±114,4	9222,5±121,3	9222,5±121,3
«Зомета»	Общая площадь герминат. центров, мкм ²	14230,83±6425,3	17142,22±8750,78	17864,17±1920,26	15438,33±4049,33
Контроль	Общая площадь герминат. центров, мкм ²	13426,67±30091,2	15561,11±3965,49	15381,39±3016,16	15381,39±3016,16
«Зомета»	Общая площадь мантийной зоны, мкм ²	340480,6±17235,79	415783,3±27711,4	497183,3±39089,5*	403611,1±18611,3
Контроль	Общая площадь мантийной зоны, мкм ²	310705,6±79974,15	367886,1±13354,99	401619,4±14905,57	401619,4±14905,57
«Зомета»	Общая площадь краевой зоны, мкм ²	541361,1±24887,15	595444,4±36589,5	669888,9±41865,2	658472,2±38979,1
Контроль	Общая площадь краевой зоны, мкм ²	539055,6±12320,58	579111,1±31017,19	651138,9±35359,52	651138,9±35359,52
«Зомета»	Общ. площадь периарт. лимф. муфт, мкм ²	597416±38148	659666±52804	717694±55976	675416±33701
Контроль	Общ. площадь периарт. лимф. муфт, мкм ²	580055±65221	637305±10516	665805±15439	665805±15439

*- обозначает достоверное отличие от контроля ($p \leq 0,05$).

При анализе лимфатических узелков мы определили повышение процентного соотношения лимфатических узелков к общей площади среза. Оно составило от 10,32% до 16,27% (7-90 сутки). Общая площадь лимфатических узелков на 7 сутки составляла $944416,7 \pm 51267,7$ мкм², к 30 суткам имела тенденцию к увеличению до $978694 \pm 50940,7$ мкм² и к 90 суткам данный показатель был равен $1048972 \pm 55489,87$ мкм². В сравнении с интактными животными выявлено повышение показателя общей площади лимфатических узелков селезенки крыс данной серии на протя-

жении всего исследования на (7,30,90) сутки на 4,48%, 7,62%, 8,18% (таб.1). В серии «реадаптации», когда введение «Зометы» прекращалось после 30 дня, общая площадь лимфатических узелков селезенки к 90 дню становилась выше контрольной на 1,82% и была равна $987333 \pm 44157,82$ мкм² (рис. 3).

Общая площадь периартериальной зоны лимфатических узелков селезенки животных получавших «Зомету» не претерпевала существенных изменений, её значения колебались в пределах от $8683,05 \pm 187,6$ мкм² (7 сутки) до

9306,66 ±198,5 мкм² (90 сутки). Необходимо отметить, что морфометрические показатели периаfterиальной зоны лимфатических узелков селезенки животных получавших «Зомету» максимально отличались от контрольных значений в сторону увеличения на 90 сутки наблюдения при этом различия составляли 0,91% (таб.1).

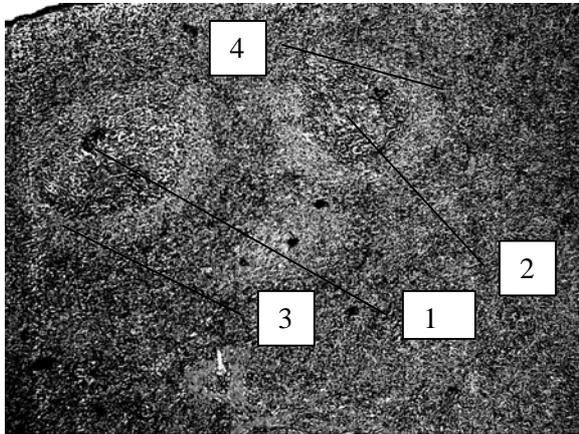


Рис 1. Микрофотография. Селезенка крысы получавшей «Зомету» на 30 сутки исследования: 1-лимфатический узелок, 2-герминативный центр, 3-мантийная зона, 4-краевая зона. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: 100^x.

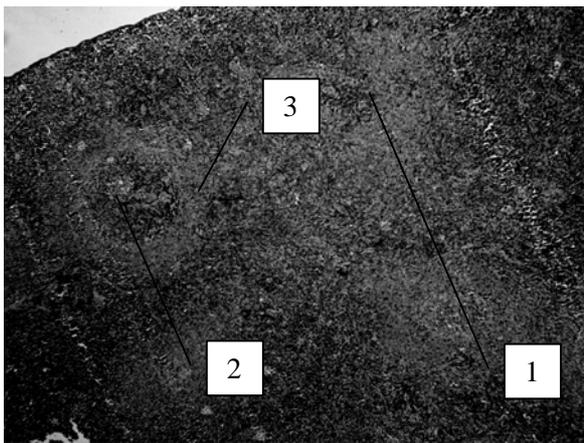


Рис 2. Микрофотография. Селезенка крысы получавшей «Зомету» на 7 сутки исследования: 1-лимфатический узелок, 2-герминативный центр, 3-мантийная зона. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: 100^x.

В серии «реадаптации» значения общей площади периаfterиальной зоны лимфатических узелков равнялись 9249,16±195,1 мкм². Следовательно данный показатель наиболее приближается к контрольным значениям, различия составляют 0,51% (в сторону увеличения).

Общая площадь герминативных центров лимфатических узелков селезенки животных получавших «Зомету» на 7 сутки составляла 14230±6425,3 мкм² к 30 суткам имела тенденцию к увеличению до 17142±8750 мкм² и к 90 суткам данный показатель был равен 17864,1±1920 мкм² (p ≤0,05). В сравнении с интактными животными выявлено повышение показателя общей площади герминативных центров в лимфатических узелках селезенки крыс данной серии на протяжении всего исследова-

вания на (7,30,90) сутки на 5,98%, 10,16%, 16,14% (таб.1). В серии «реадаптации», когда введение «Зометы» прекращалось после 30 дня, общая площадь герминативных центров в лимфатических узелках селезенки к 90 дню становилась выше контрольных значений на 0,37% и была равна 15438,3±4049 мкм²(рис.3).

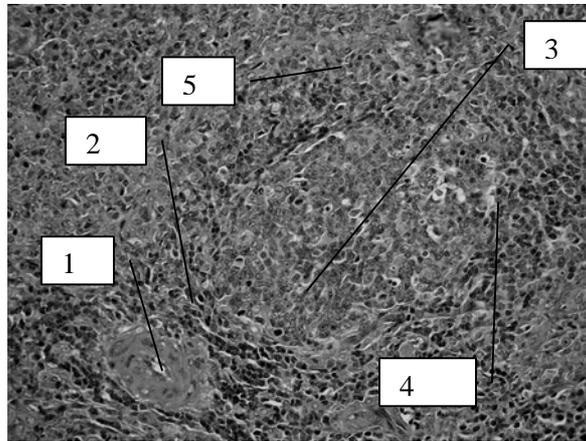


Рис 3. Микрофотография. Селезенка крысы из серии «реадаптации», которая получала «Зомету»: 1-просвет центральной артерии, 2-периаfterиальная зона, 3-герминативный центр, 4-мантийная зона, 5-маргинальная зона. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: 400^x.

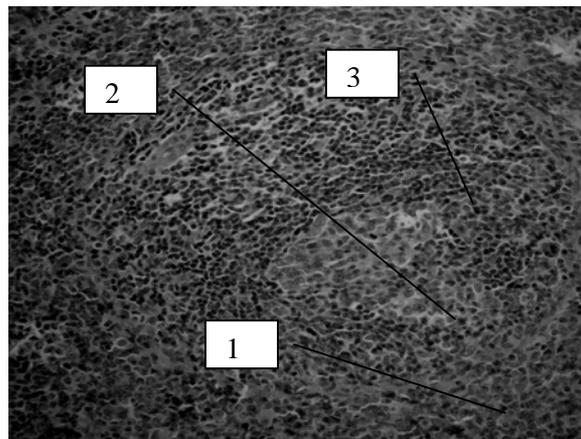


Рис 4. Микрофотография. Селезенка крысы получавшей «Зомету» на 90 сутки исследования: 1-лимфатический узелок, 2-герминативный центр, 3-мантийная зона, 4-краевая зона. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: 400^x.

Мантийная зона на обзорных гистологических срезах подопытных животных шире, чем у контрольных животных и имеет четкую границу с маргинальной зоной и с центром размножения. Общая площадь мантийной зоны селезенки животных получавших «Зомету» на 7 сутки составляла 340480,6±17235,7 мкм², к 30 суткам имела тенденцию к увеличению до 415783,3±27711,4 мкм² и к 90 суткам данный показатель был равен 497183±30089,5 мкм² (p ≤0,05) (рис.4). В сравнении с интактными животными выявлено повышение показателя общей площади мантийной зоны селезенки крыс данной серии на протяжении всего исследова-

ния на (7,30,90) сутки на 9,58%, 13,06%, 23,79% (таб.1). В серии «реадаптации», когда введение «Зометы» прекращалось после 30 дня, общая площадь мантийной зоны селезенки к 90 дню становилась ниже контрольной на 0,49% и была равна $403611,1 \pm 18611,3$ мкм² (рис.3).

Краевая (маргинальная) зона является переходной областью вокруг лимфатического узелка селезенки. Она расположена снаружи от мантийной зоны и в виде узкой полоски охватывает лимфатические узелки. В краевой зоне много капилляров, которые имеют связь с красной пульпой и венозными синусоидами селезенки (рис. 3,4). При сравнении с контролем мы обнаружили незначительное повышение по количеству клеток этой зоны. Общая площадь краевой зоны селезенки животных получавших «Зомету» имела значения в пределах от 541361 ± 24887 мкм² (7 сутки) до 669889 ± 41864 мкм² (90 сутки). Необходимо отметить, что морфометрические показатели краевой зоны лимфатических узелков селезенки животных получавших «Зомету» максимально отличались от контрольных значений в сторону возрастания на 90 сутки наблюдения при этом различия составляли 2,87%. В серии «реадаптации» значения общей площади периадвентициальной зоны лимфатических узелков равнялись 658472 ± 38979 мкм², причем отличия от контроля составили 1,12% в сторону возрастания (рис. 2,4). Следовательно данный показатель наиболее приближается к контрольным значениям на 7 сутки наблюдения, различия составляли 0,42% (в сторону возрастания) и наиболее отличается от контроля на 90 сутки наблюдения (рис.2,5).

Периадвентициальные лимфоидные муфты имеют сложно-фигурные формы. Данная зона заселена преимущественно Т-лимфоцитами, которые участвуют в обеспечении клеточного иммунитета (рис. 5).

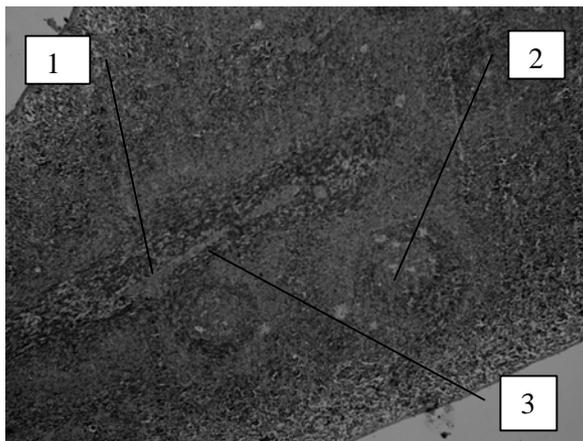


Рис 5. Микрофотография. Селезенка крысы получавшей «Зомету» на 7 сутки исследования : 1-пульпарные тяжи, 2-лимфатический узелок, 3- периадвентициальная лимфоидная муфта. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: 100^x.

Общая площадь периадвентициальных лимфоидных муфт селезенки животных получавших «Зомету» на 7 сутки составляла $597416,7 \pm 38148$ мкм², к 30 суткам имела тенденцию к увеличению

до 659666 ± 52804 мкм² и к 90 суткам данный показатель был равен 717694 ± 55976 мкм². В сравнении с интактными животными нами выявлено повышение показателя общей площади селезенки периадвентициальных лимфоидных муфт данной серии на протяжении всего исследования на (7,30,90) сутки на 2,99%, 3,5%, 7,79%. В серии «реадаптации», когда введение «Зометы» прекращалось после 30 дня, общая площадь периадвентициальной зоны селезенки к 90 дню становилась выше контрольной на 1,44% и была равна 675416 ± 33701 мкм² (рис.5).

Таким образом, можно сделать **ВЫВОДЫ**:

1. При воздействии на организм подопытных животных бисфосфонатом «Зомета» наблюдается увеличение всех показателей структур селезенки, которые проявляются в гиперфункции данного органа.
2. Выявлена тенденция минимальных изменений в сторону увеличения показателей на 7 сутки наблюдения и максимальных изменений к 90 суткам наблюдения.
3. В сроке «реадаптации» когда за 60 дней бисфосфонат «Зомета» в организм животного не поступал наблюдается «стремление» показателей приблизиться к контрольным значениям.
4. Наиболее выраженные изменения происходили в мантийной зоне лимфатических узелков селезенки, что свидетельствует о повышенном антителообразовании, активизации гуморального иммунитета.

Перспективы дальнейших исследований:

При печати дальнейших статей планируется описать морфогенез селезенки половозрелых белых крыс при воздействии на них гидрокортизоном.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Аляев Ю.Г., Абутаева Б. Д. Обоснование применение зометы у больных местнораспространенным раком простаты/ Ю.Г.Аляев, Б.Д. Абутаева // II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Рациональная фармакотерапия в урологии 2008». Москва, 7-8 февраля 2008 г.- С. 10-11.
2. Бахмет А.А. Строение лимфоидных структур селезенки крыс при воздействии острого эмоционального стресса/ А.А.Бахмет // Морфология. - 2004. - Т.125, №1.-С. 55-58.
3. Кащенко С.А. Строение селезенки крыс старческого возраста после тимэктомии / С.А. Кащенко // Український медичний альманах. - 2004 - Т. 7, № 2. - С. 79-82.
4. Lisen R. Resistance of cytotoxic lymphocytes to perforin-mediated killing / Lisen R.// J.Exp. Med. - 1984. - V. 169. - P. 211-225.
5. Poapolathep A., Nagata T., Suzuki H. Development of early apoptosis and changes in lymphocyte subsets in lymphoid organs of mice orally inoculated with nivalenol/ Poapolathep A., Nagata T., Suzuki H. // Exp. Mol. Pathol.- 2003.- V.75, № 1. - P. 74-79.
6. Warner L.A., Holt P.G., Mayrhofer G. Alveolar macrophages. VI. Regulation of alveolar macrophage-mediated suppression of lymphocyte proliferation by a putative T cell / Warner L.A., Holt P.G., Mayrhofer G. // Immunology. - 1981.- V.42, № 1.- P.137-147.

Надійшло 24.10.2009р.

Рецензент доц. В.М.Волошин