
Вопросы общей патологии

УДК 576.08+615.076.9

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРКАЛЬЦИЕМИИ

О. В. Мельникова

ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова», 428000, г. Чебоксары, Московский просп., д. 15

РЕЗЮМЕ *Цель* – морфологический анализ реактивных изменений функциональных зон селезенки крыс в ответ на обогащение водного рациона хлоридом кальция.

Материал и методы. Объектом исследования служили 64 крысы массой 150–200 г. В первую группу вошли контрольные животные ($n = 32$), получавшие питьевую воду; во вторую – подопытные животные ($n = 32$), получавшие питьевую воду с добавлением хлорида кальция в течение двух месяцев. Морфологическое исследование включало: определение количества и площади первичных и вторичных лимфоидных узелков селезенки, измерение общей площади белой и красной пульпы и их соотношений. Морфометрические границы лимфоидных узелков определяли сигмальным методом. Содержание кальция в сыворотке крови – колориметрическим методом с применением о-крезолфталеинкомплексона.

Результаты. На фоне длительного воздействия кальция, поступавшего с питьевой водой, происходят гиперпластические изменения белой пульпы селезенки лабораторных крыс: лимфоидные узелки становятся склонны к слиянию и укрупнению, увеличивается количество и площади первичных и вторичных лимфоидных узелков на всей поверхности срезов. В опытной группе животных наблюдается количественное преобладание первичных (66,6%) лимфоидных узелков над вторичными, а в контрольной группе их количество остается примерно одинаковым. Число структурных компонентов белой пульпы селезенки с центром размножения сокращается на 9%, большая их часть представлена лимфоидными узелками с неразвитым герминативным центром (30,6%). Обогащение питьевой воды кальцием сопровождается изменением соотношения функциональных зон селезенки: существенным увеличением площади белой пульпы и уменьшением площади красной пульпы. У экспериментальных животных происходит достоверное увеличение содержания общего кальция в сыворотке крови на $0,34 \pm 0,08$ ммоль/л ($11,5 \pm 2,61\%$ от контрольных значений).

Выводы. При повышении концентрации общего кальция в крови опытных крыс наблюдаются гиперпластические нарушения белой пульпы селезенки, что сопровождается изменением соотношения функциональных зон.

Ключевые слова: селезенка, препараты кальция, гиперкальциемия, морфофункциональная характеристика, лимфоидные узелки, красная пульпа.

Ответственный за переписку (corresponding author): olga1407@bk.ru

Кальций – самый распространенный макроэлемент в организме человека. Он активно участвует в поддержании нормального функционирования системы гомеостаза, в интеграции функций организма, является кофактором активации многих ферментов и ферментных комплексов [3]. Доказано, что кальций контролирует процессы антитеклообразования, угнетает клеточную пролиферацию и дифференциацию [1].

Всестороннее исследование влияния макроэлементов на органы иммунной системы, особенно на тканевом уровне, необходимо для избирательного, целенаправленного воздействия на нарушенные гистофизиологические процессы,

что считается обязательным условием успешной иммуномодуляции [8]. Исследование структурно-функциональных особенностей селезенки остается актуальной проблемой, так как она является самым крупным периферическим органом иммуногенеза. Селезенка ответственна за эффективность клеточного и гуморального иммунного ответа как врожденного, так и приобретенного иммунитета [9].

Целью настоящего исследования стало изучение морфофункционального состояния структур селезенки лабораторных крыс при длительном поступлении в организм соединения кальция с питьевой водой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 64 белые нелинейные лабораторные крысы-самцы одного возраста и одной массы (150–200 г). Исследуемые животные разделены на 2 группы: первая группа – контрольная ($n = 32$), животные которой получали по требованию питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02; вторая группа – подопытные животные ($n = 32$), получавшие по требованию питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02, с добавлением хлорида кальция в концентрации 235 мг/л в пересчете на кальций. Ежедневно в течение двух месяцев подопытные животные получали с питьевой водой в среднем 8,1–10,2 мг/кг кальция.

Выведение из эксперимента лабораторных крыс каждой группы выполнялось на 60-е сутки методом декапитации с последующим выделением селезенки, ее фиксацией в нейтральном 10%-ном растворе формалина, проводкой через спирты возрастающей концентрации и заливкой в парафин. Окраска серийных срезов осуществлялась гематоксилином и эозином по стандартной методике [4].

Все действия, предусматривающие контакты с экспериментальными животными, проводились согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г.), требованиям Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным Всемирной медицинской ассоциации (2000) и Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986). Исследование одобрено локальным этическим комитетом медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова» (протокол № 3/1 от 30.11.2015 г.).

Морфометрическое исследование селезенки осуществлялось с использованием компьютерной программы «Sigma Scan Pro 5.0» и включало: определение количества и площади первичных и вторичных лимфоидных узелков (ЛУ) селезенки, а также измерение общей площади белой и красной пульпы и их соотношений. Анализ проводился на всех поверхностях срезов органов под световым микроскопом «Микмед-5» с винтовым окулярным микрометром МОВ-1.

Распределение ЛУ селезенки по условным группам в зависимости от их морфометрических границ выполнялось с помощью метода сигмальных отклонений [7]: $M \pm \sigma$ – средние, более $M + \sigma$ – большие, менее $M - \sigma$ – малые. Морфометрические

границы для первичных ЛУ: малые – 549,0–883,0 мкм², средние – 883,1–20 729,5 мкм², крупные – 20 729,6–62014,0 мкм². Морфометрические границы для вторичных ЛУ: малые – 24 094,0–53 379,1 мкм², средние – 53 379,2–212 659,7 мкм², крупные – 212 659,8–501 600,0 мкм².

Для определения содержания общего кальция в сыворотке крови животных использовался метод колориметрии с о-крезолфталеинкомплексом. Количественный анализ проводился с использованием набора «Кальций-Витал» на биохимическом фотометрическом кинетическом анализаторе АБХФк-02-«НПП-ТМ» («БиАн») с длиной волны 540–590 нм.

Статистическая обработка полученных цифровых данных осуществлялась с помощью программы Microsoft Office Excel с определением стандартной ошибки, стандартного отклонения и оценкой значимости различия средних величин по t-критерию Стьюдента и непараметрическим критериям Вилкоксона – Манна – Уитни. В работе приведены три уровня достоверности с вероятностью погрешности $p < 0,008$, $p < 0,01$ и $p < 0,04$ [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В селезенке крыс контрольной группы лимфоидные узелки (ЛУ) округлой или удлинённой формы часто встречаются группами по 2–3 штуки. Как правило, лимфоидные узелки без герминативного центра располагаются на периферии органа, редко встречаясь в глубине паренхимы. Обратная зависимость обнаружена в отношении вторичных ЛУ. Для оценки степени развития иммунокомпетентного компартамента паренхимы органа проведены количественные измерения лимфоидного аппарата селезенки. В селезенке крыс контрольной группы практически равное количество в срезах составляют первичные (46,6%) и вторичные (50,7%) компоненты белой пульпы ($p < 0,05$). Однако среди лимфоидных узелков с наличием герминативного центра преобладают структуры с незрелой реактивной зоной (32,8%). За основу морфологических критериев зрелости герминативного центра были приняты 4 стадии развития ЛУ [2]: I–III стадии представляют незрелый центр размножения с большим числом малодифференцированных и митотически делящихся клеток лимфоцитопозитического ряда; в конечной IV стадии развития в центре ЛУ формируется светлый участок с единичными макрофагами и фигурами митозов, вокруг которого расположена более темная «корона» мантийной зоны из малых лимфоцитов, преимущественно В-клеток памяти.

В срезах селезенки лабораторных крыс, получавших кальций, обращают на себя внимание значи-

тельно более крупные ЛУ, образовавшиеся путем объединения и слияния нескольких соседних. В результате этого ЛУ приобретают полиморфную форму. Реакция белой пульпы селезенки крыс на длительное дозированное воздействие соединения кальция заключается в возрастании числа первичных ЛУ (66,6%), являющихся «резервными» иммунными структурами, по сравнению с вторичными (33,4%). Следует отметить, что в селезенке подопытных животных первичные ЛУ располагаются не только под капсулой органа, но в равных количествах локализируются и в глубине паренхимы органа. Число структурных компонентов белой пульпы селезенки с центром размножения сокращается на 9%; в их составе большая часть представлена ЛУ с неразвитым герминативным центром (30,6%) ($p < 0,05$).

Общее количество ЛУ на всей поверхности срезов селезенки контрольных животных составило $33,11 \pm 5,58$. На фоне смены макроэлементного рациона количество лимфоидных узелков незначительно увеличивается – до $36,2 \pm 5,51$ (на 8,6%, $p < 0,04$).

При визуальной оценке, подтвержденной морфометрическими исследованиями, установлено, что основную массу белой пульпы обеих групп животных составляют ЛУ средних размеров. На фоне употребления водного раствора хлорида кальция количество крупных узелков возрастает: первичных – на 8,6%, вторичных – на 12,7% ($p < 0,05$).

Для оценки уровня функциональной активности лимфоидного аппарата селезенки проведено морфометрическое исследование всех функциональных зон органа. После обогащения питьевого рациона хлоридом кальция в течение 60 суток наблюдаются гиперпластические изменения белой пульпы селезенки. Площадь, занимаемая как первичными, так и вторичными лимфоидными узелками, увеличивается на 31,5 и 14,5% соответственно. Компенсаторно площадь красной

пульпы подопытных животных сокращается на четверть (25,4%) ($p < 0,05$) (табл. 1).

В целом эти изменения отчетливо прослеживаются по соотношению площадей белой и красной пульпы. В селезенке контрольных крыс данный показатель варьирует от 1 : 3,09 до 1 : 6,48, что в среднем составляет 1 : 4,71 ($\pm 0,38$). Установлено, что обогащение питьевой воды кальцием у подопытных животных сопровождается изменением соотношения функциональных зон селезенки – существенным увеличением площади белой пульпы и, соответственно, сокращением площади красной пульпы. Данный показатель находится в пределах от 1 : 1,4 до 1 : 5,75, в среднем равен 1 : 3,11 ($\pm 0,42$).

Согласно данным научной литературы [5], селезенка лабораторных крыс обеих групп относится к метаболическому (депонирующему) типу, в связи с преобладанием красной пульпы. Однако на фоне обогащения рациона кальцием наблюдается тенденция к функциональной перестройке органа с преобладанием иммунных процессов, что можно расценивать как субстрат для активации иммунного ответа, протекающего в селезенке.

Основным признаком экспериментальной гиперкальциемии является повышенное содержание кальция в плазме крови. Концентрация общего кальция в крови контрольной группы крыс находилась в пределах в пределах от 2,13 до 2,68 ммоль/л ($2,42 \pm 0,01$ ммоль/л). После 60-дневного регулярного употребления водного раствора хлорида кальция в крови экспериментальных животных происходит статистически значимое увеличение содержания общего кальция в сыворотке крови на $0,41 \pm 0,01$ ммоль/л ($14,39 \pm 0,69\%$ от контрольных значений) ($p < 0,008$). У подопытных животных его уровень варьирует от 2,51 до 3,16 ммоль/л, что в среднем составляет $2,86 \pm 0,02$ ммоль/л. Полученные данные лабораторно под-

Таблица 1. Морфометрические показатели структурных компонентов белой и красной пульпы селезенки крыс после длительного употребления водного раствора хлорида кальция ($M \pm m$)

Морфометрические параметры селезенки	Контрольная группа	Подопытные животные	Степень и направленность изменений
Площадь первичных ЛУ, мкм ²	8460,4 \pm 528,2	12 344,6 \pm 597,5*	+31,5%
Площадь вторичных ЛУ, мкм ²	123 166,4 \pm 4588,1	143 959,1 \pm 7754,8*	+14,5%
Общая площадь всех компонентов белой пульпы, мкм ²	2 547 889,0 \pm 491 912,8	2 915 884,0 \pm 32 587,7*	+12,7%
Площадь красной пульпы, мкм ²	11 353 090,0 \pm 2 194 544,0	8 472 904,0 \pm 1 079 405,0*	-25,4%
Отношение площади белой пульпы к площади красной пульпы	1 : 4,71 ($\pm 0,38$)	1 : 3,11 ($\pm 0,42$)*	-34,0%

Примечание. Статистическая значимость различий: * – $p < 0,05$.

тверждают воздействие водного раствора хлорида кальция на организм.

По данным некоторых исследователей [5, 9], увеличение количества первичных ЛУ селезенки свидетельствует о высоком уровне процессов лимфоцитопоза и бласттрансформации клеток органа. Оценивая данные изменения, можно сделать заключение об увеличении пролиферативной активности с развитием первичных ЛУ, которые часто рассматривают как «резервные». Таким образом, результаты исследования эмпирически доказали влияние кальция на адаптационную морфологическую перестройку всех функциональных зон селезенки лабораторных крыс.

ВЫВОДЫ

1. На фоне 60-дневного употребления хлорида кальция с питьевой водой происходят гиперпластические изменения белой пульпы селезенки лабораторных крыс: развивается тенденция лимфоидных узелков к слиянию и укрупнению, увеличивается количество первичных и вторичных лимфоидных узелков на всей поверхности срезов и их площади.

2. У подопытных животных при воздействии кальция наблюдается количественное преобладание первичных (66,6%) лимфоидных узелков над вторичными, в отличие от контрольной группы, где обнаружено их примерно равное количество.
3. Число структурных компонентов белой пульпы селезенки с центром размножения на фоне воздействия кальция сокращается на 9%, в их составе большую часть составляют лимфоидные узелки с неразвитым герминативным центром (30,6%).
4. Обогащение питьевой воды кальцием сопровождается изменением соотношения функциональных зон селезенки: существенным увеличением площади белой пульпы и сокращением площади красной пульпы.
5. После 60-дневного употребления водного раствора хлорида кальция происходит статистически значимый рост содержания общего кальция в сыворотке крови экспериментальных животных на $0,34 \pm 0,08$ ммоль/л ($11,5 \pm 2,61\%$ от контрольных значений).

ЛИТЕРАТУРА

1. Аюшиева, С. Ц. Экспериментальное обоснование применения минеральных вод нарзановского типа при иммуносупрессии / С. Ц. Аюшиева, И. Э. Раднаева, В. Б. Хобракова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 2 (72). – С. 161–164.
2. Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский [и др.]. – 6-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 446–447.
3. Златник, Е. Ю. Дозозависимое действие наночастиц переходных металлов на морфофункциональное состояние селезенки / Е. Ю. Златник, Л. В. Передрева // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7. – С. 282–285.
4. Капитонова, М. Ю. Компьютерная оценка компартиментализации селезенки растущих крыс в различные возрастные периоды / М. Ю. Капитонова, Т. М. Аверина // Морфология. – 2001. – Т. 120, № 4. – С. 73.
5. Дефицит витаминов и микроэлементов у детей: современные подходы к коррекции / Н. А. Коровина, И. Н. Захарова, А. Л. Заплатников, Е. Г. Обычная. – М. : Медпрактика-М, 2004. – 56 с.
6. Макалиш, Т. П. Морфофункциональные особенности селезенки при воздействии на организм факторов различного генеза / Т. П. Макалиш // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, № 1, Ч. 1. – С. 265–269.
7. Платонов, А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, логика, компьютерные методы / А. Е. Платонов. – М. : Изд-во РАМН, 2000. – 52 с.
8. Оберлис, Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / Д. Оберлис, Б. Харланд, А. Скальный. – СПб. : Наука, 2008. – 273 с.
9. Онтогенетические аспекты стромально-паренхиматозных взаимоотношений в селезенке / А. И. Рябина [и др.] // Морфология. – 2008. – Т. 132, № 2. – С. 58.

SPLEEN MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS IN EXPERIMENTAL HYPERKALEMIA IN RATS

O. V. Melnikova

ABSTRACT

Objective – morphological analysis of reactive alterations of spleen morphofunctional zones in rats in response to enrichment of water ration with calcium chloride.

Material and methods. 64 rats with body mass amounting to 150–200 g were examined. The animals of the 1 control group (n = 32) were given table water, the animals of the 2 experimental group (n = 32) were given table water with calcium chloride within two months. Morphological investigation included the definition of the quantity and the

square of primary and secondary spleen lymphoid nodes, the measurement of total area of white and red pulp and their correlation. Morphometric borders of lymphoid nodes were determined by sigmal method; calcium content in blood serum was defined by colorimetric method with o-crezolphtaleincomplexon use.

Results. On the background of prolonged impact of calcium with table water there were marked hyperplastic changes of white spleen pulp in laboratory rats: lymphoid nodes were inclined to confluence and enlargement, quantity and square of primary and secondary lymphoid nodes at all surface of sections were increased. Quantitative prevalence of primary (66,6%) lymphoid nodes beyond the secondary ones was demonstrated in experimental group; their quantity in control group was comparatively equal. The number of structural components of white spleen pulp with reproduction center was reduced by 9%; the most part of them was presented by lymphoid nodes with undeveloped germinal center (30,6%). The enrichment of table water by calcium was accompanied by the alteration of spleen functional zones ratio: significant increase of white pulp square and decrease of red pulp square. The trustworthy rise in general calcium content in blood serum by $0,34 \pm 0,08$ mmol/l (11,5 + 2,61% from control parameters) was showed in experimental animals.

Conclusions. Hyperplastic disorders of spleen white pulp were noted in experimental rats blood in general calcium concentration heightening; it was accompanied by functional zones ratio alteration.

Key words: spleen, calcium medicaments, hyperkalemia, morphofunctional characteristics, lymphoid nodes, red pulp.