



УДК 615.4+574:616

Микроморфологические изменения в селезёнке лабораторных белых мышей при биопробе на токсичность рыб из озера Котокельское (Прибайкалье)

С. В. Пронина¹, Н. М. Пронин²

¹Бурятский государственный университет, Улан-Удэ

²Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

E-mail: SPronina06@mail.ru

Аннотация. Впервые представлены материалы по патогистологическим изменениям в селезёнке белых мышей при влиянии токсина, содержащегося в рыбе из оз. Котокельское в период вспышки алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии (2008–2009 гг.).

Ключевые слова: селезёнка, лимфоидная ткань, токсин, гемосидерин, лимфоциты, тканевые базофилы.

Введение

Селезёнка является крупнейшим органом кроветворения и иммунной защиты у позвоночных животных. При попадании в кровь антигенов в ней происходят антигензависимая пролиферация и дифференцировка В- и Т-лимфоцитов. За счёт уникального кровоснабжения селезёнка может осуществлять селекцию форменных элементов крови. Она выполняет и ряд регуляторных функций, вырабатывая биологически активные вещества, стимулирует фагоцитарную активность клеток крови и процессы кроветворения в красном костном мозге. В ней накапливаются и элиминируются тромбоциты, повреждённые и/или состарившиеся эритроциты. Железо, высвобождающееся при гибели эритроцитов, доставляется макрофагами в печень для синтеза желчных пигментов и в красный костный мозг, где оно используется при эритропоэзе [2].

Вспышки гаффской (сартланско-юковской) болезни или алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии (АТПМ) зарегистрированы в различных географических регионах России и зарубежья. Во всех известных случаях возникновение этого заболевания у человека и домашних животных происходило при потреблении разных видов рыб, содержащих токсин неопределённой природы. Первая вспышка АТПМ в Восточной Сибири произошла весной 2008 г. среди жителей сёл, расположенных на побережье оз. Котокельское, которое находится в двух километрах от восточного берега оз. Байкал. В этот период здесь отмечалась массовая гибель рыб, рыбоядных

птиц и домашних животных (кошек, собак) [10]. Летом того же года в населённых пунктах приозерья заболели 16 человек, из них один с летальным исходом. Всего на территории Республики Бурятия в 2008–2011 гг. зарегистрирован 21 заболевший с диагнозом АТПМ. Причиной отравления всех пострадавших стало употребление рыбы из оз. Котокельское.

Известно, что у человека самыми характерными признаками заболевания АТПМ являются поражение нервно-мышечного аппарата, нарушение функции почек, сердечной мышечной ткани [5; 12; 14]. У лабораторных животных при экспериментально вызванной АТПМ наблюдали сильные патогистологические изменения в скелетной мускулатуре, почках, в нервной и пищеварительной системах [3; 8]. Однако, несмотря на длительную историю изучения АТПМ (более 70 лет), полное представление о структурно-функциональных изменениях внутренних органов пострадавших отсутствует. В имеющихся публикациях по АТПМ сведения об изменениях в органах кроветворения и иммунной защиты, в том числе в селезёнке, очень краткие или отсутствуют. В связи с этим на экспериментальных животных (кошки и белые мыши) согласно рекомендациям [1] были поставлены биопробы на токсичность рыб из оз. Котокельское.

Результаты исследования патогистологических изменений в органах мышей из биопробы частично опубликованы [6; 11], в том числе обсуждались сравнительные данные по микроморфологическим изменениям в печени рыб из оз. Котокельское и мышей [13]. В данном сообщении представлены результаты патомор-

фологического исследования селезёнки белых мышей из биопробы на токсичность рыб из оз. Котокельское в период вспышки АТПМ.

Материалы и методы

Биопроба для выяснения токсичности рыб из оз. Котокельское была поставлена на самцах лабораторных белых мышей линии СВА массой 25–30 г. в виварии Бурятской республиканской научно-производственной лаборатории при участии Э. Р. Бодиева, светлой памяти которого посвящается эта статья.

Животные были разделены на две группы по 4 экз. Мыши из первой группы получали дважды в сутки внутренние органы (без желчного пузыря) окуня, из второй – плотвы, выловленных в оз. Котокельское. Эксперимент длился с 25 марта по 4 апреля. Мышей из контрольной группы (3 экз.) кормили органами от рыб, отсутствие ядовитых свойств которых не вызывало сомнений. Животных выводили из эксперимента под лёгким эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ № 755 от 12.08.77).

Селезёнку и другие органы мышей фиксировали 10%-ным нейтральным формалином и жидкостью Карнуа. Морфологические исследования осуществляли общепринятыми в патоморфологии методами [7]. Парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм после депарафинизации окрашивали гематоксилином Эрлиха-эозином, азур II-эозином, 0,5%-ным водным раствором толуидинового синего. Дифференцировку пигментов проводили по срезам, которые окрашивали берлиновым синим по Перльсу. Гемосидерин окрашивался в синий цвет, липофусцин – в жёлтый, меланин – в коричневый. Описание и фотографирование микроморфологических изменений в органе осуществляли под микроскопом MC300A (Micros, Austria). Относительную площадь, занимаемую белой пульпой, определяли с использованием программы Motic Images 2000 v. 1.3 при увеличении в 40 раз. Абсолютное содержание тканевых базофилов (тучных клеток) и макрофагов подсчитывали в 25 полях зрения на 5-ти срезах от каждого животного при увеличении в 400 раз. Данные морфометрических измерений обработаны статистически с помощью пакета программ Statistica v.6.0 методом Mann – Whitney U-тест для непараметрических данных при уровне достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты

Результаты биопробы. У экспериментальных белых мышей на 3–5-е сутки появились

чёткие клинические признаки синдрома АТПМ [1]: неопрятный вид, волосяной покров взъерошен, глаза прищурены, лихорадка, угнетённое вялое состояние, диарея, животные впадали в оцепенение и принимали форму треугольника. У одной мыши на 5-е сутки начался парез конечностей, на 6-е сутки (30 марта) она пала. Остальные животные были выведены из эксперимента 2 и 4 апреля путём легкого эфирного наркоза. При вскрытии у животных отмечены увеличение печени, энтерит, очаговый отёк лёгких, очаговая гиперемия печени.

Результаты морфологических исследований. В селезёнке контрольных мышей чётко различимо подразделение паренхимы на красную и белую пульпу, представленную периартериальными влагалищами и лимфатическими узелками, большинство которых имеют правильную округлую форму (рис. 1). В них хорошо заметны функциональные зоны: Т-зависимая зона (плотное скопление лимфоцитов вокруг центральной артерии) и В-зависимая светлая зона (см. рис. 1). Лимфатические узелки окружены маргинальной зоной. Границы между узелками и красной пульпой чёткие. Кровеносные суды в органе умеренно кровенаполнены.

В селезёнке экспериментальных мышей наблюдалось нарушение гемоциркуляции различной степени тяжести. У двух мышей, получавших органы окуня, трабекулярные и пульпарные сосуды кровенаполнены, синусоиды пустые. У мыши, находившейся на 5-е сутки в агональном состоянии и погибшей на 6-е сутки, селезёнка была анемичной. Для остальных 5-ти особей характерна гиперемия органа, венозный и синусоидный гемостаз.

Относительное содержание белой пульпы у экспериментальных мышей достоверно ниже по сравнению с контрольной группой (табл.). Лимфатические узелки переменны по размерам и форме. Форма большинства узелков неправильная (рис. 2), границы часто нечёткие из-за инфильтрации лейкоцитами окружающей красной пульпы. Функциональные зоны в узелках слабо различимы. Как видно из данных таблицы, расположение лимфоцитов в функциональных зонах лимфатических узелков у экспериментальных мышей более разреженное по сравнению с контрольными животными. В центре узелков часто встречаются клетки с признаками дистрофии и некроза. У погибшей мыши лимфатические узелки в состоянии атрофии (см. рис. 2). Площадь Т-зависимой зоны сильно сокращена или отсутствует, клетки герминативной зоны подвержены дистрофии и некрозу.

Селезёнка экспериментальных мышей по сравнению с контрольными достоверно богаче тканевыми базофилами (тучными клетками, mast cells) и макрофагами, содержащими гемосидерин (см. табл). Гемосидеринсодержащие макрофаги обычно локализуются в красной пульпе (рис. 3), в белой пульпе они единичны. Тканевые базофилы также располагаются в красной пульпе. У контрольных и эксперимен-

тальных мышей в селезёнке присутствуют мегакариоциты. Располагаются они преимущественно по периферии органа. У экспериментальных мышей их меньше и среди них чаще встречаются клетки с признаками дегенерации и некроза. Различия по абсолютному содержанию мегакариоцитов у контрольных ($1,66 \pm 0,17$) и экспериментальных ($1,26 \pm 0,11$) незначительны.

Таблица

Показатели морфологических изменений в селезёнке белых мышей в опыте с биопробой и в контроле

Показатели	Экспериментальные		Контрольные	
	M±m	Мин. – макс.	M±m	Мин. – макс.
Относительная площадь, занимаемая белой пульпой	19,4±1,21	14,4–24,3	36,4±2,66	27,2–40,4
Плотность расположения лимфоцитов в периартериальной зоне	59,1±2,70	48,7–64,4	88,3±2,51	87,5–89,6
Гемосидеринсодержащие макрофаги	13,6±0,68	5,3–28,1	5,1±0,32	3,3–6,9
Тканевые базофилы (mast cells)	3,9±0,29	0,9–10,4	1,2±0,14	0,6–1,6

Примечание: различия по всем показателям достоверны ($p < 0,05$).

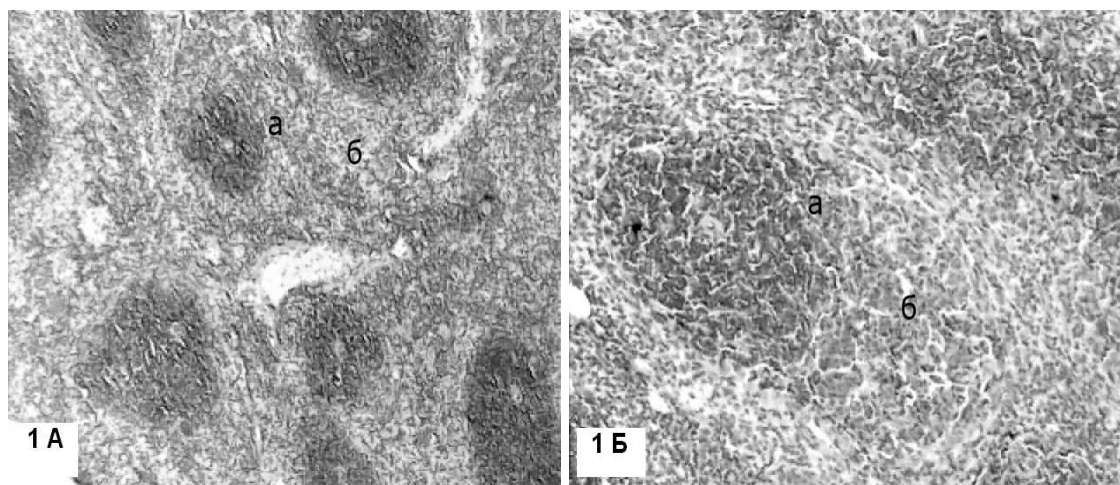


Рис. 1. Селезёнка белых мышей (контроль). Окраска гематоксилин-эозином.

А – увел. в 40 раз: а – лимфатический узелок (белая пульпа); б – красная пульпа. Б – увел. в 100 раз: а – периартериальная зона лимфатического узелка; б – реактивный центр узелка

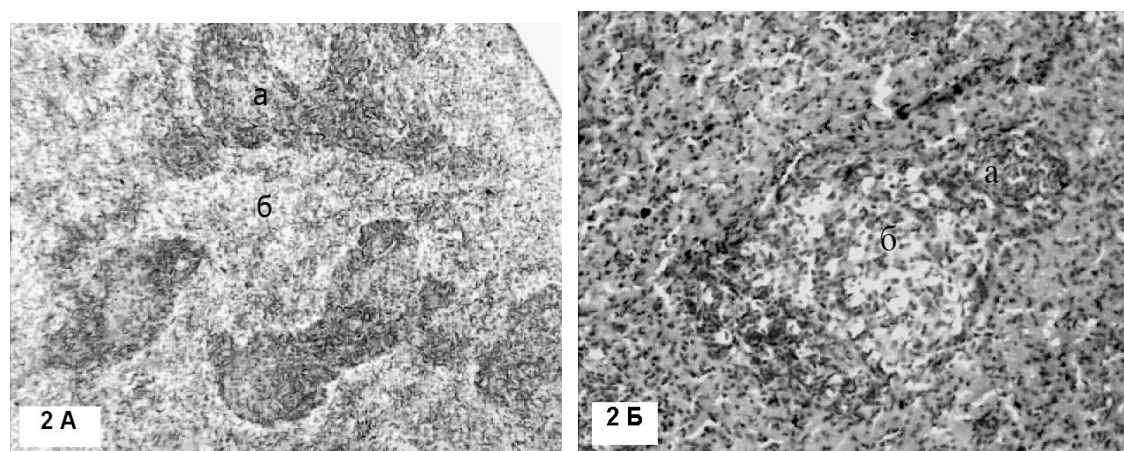


Рис. 2. Селезёнка белых мышей (биопроба). Окраска гематоксилин-эозином.

А – увел. в 40 раз: а – лимфатический узелок (белая пульпа); б – красная пульпа. Б – увел. в 100 раз: а – периартериальная зона деструктивного лимфатического узелка; б – центральная зона лимфатического узелка, клетки в состоянии дистрофии и некроза

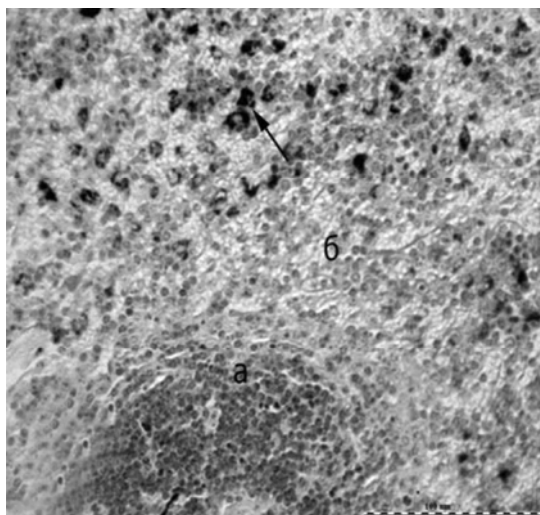


Рис. 3. Гемосидеринсодержащие макрофаги в селезёнке экспериментальных мышей (биопроба). Окраска по Перльсу. Увел. в 100 раз: а – белая пульпа; б – красная пульпа

Обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют об уменьшении относительной площади белой пульпы (лимфоидной ткани) в селезёнке мышей, кормленных рыбой из оз. Котокельское, почти в два раза. Если учесть более рыхлое расположение лимфоцитов в лимфатических узелках у мышей, получавших такую рыбу, то этот показатель должен быть больше. Сокращение площади лимфоидной ткани в селезёнке, возможно, обусловлено снижением интенсивности гемопоэза в центральных кроветворных органах, а также усилением миграции этих клеток в слизистую пищеварительного тракта (область первичного поступления токсина). В результате этого в слизистой оболочке кишечника мышей, кормленных рыбой из оз. Котокельское, в три раза увеличивается содержание интраэпителиальных лимфоцитов [6]. Сокращение площади белой пульпы в селезёнке, где происходит антигензависимая бласттрансформация Т- и В-лимфоцитов и образование эффекторных клеток гуморального и клеточного иммунитета, позволяет говорить о значительном снижении роли селезёнки мышей в иммунологических реакциях против токсина, содержащегося в рыбах из оз. Котокельское.

Увеличение числа гемосидеринсодержащих макрофагов в селезёнке экспериментальных мышей (в 2,7 раза) свидетельствует об усилении деструкции эритроцитов, что связано с повреждением эритроцитов или ускорением их старения, а возможно, имеют место оба процесса.

Опираясь только на результаты микроморфологического исследования, не представляет-

ся возможным точно определить функциональную роль тканевых базофилов в селезёнке мышей. Однако более чем трёхкратное увеличение абсолютного их содержания в селезёнке экспериментальных мышей может свидетельствовать об аллергическом воздействии токсина, накапливающегося в рыбе оз. Котокельское в период вспышки АТПМ. Согласно литературным данным, тканевые базофилы (тучные клетки) являются полифункциональными. Они участвуют во многих патологических процессах и приспособительных реакциях [9]. В обобщающей публикации, посвящённой секреторным механизмам и секреторным продуктам этих клеток [4], на основе анализа литературных данных сделано заключение о том, что в гранулах тучных клеток накапливается широкий спектр биологически активных веществ. Эти вещества влияют на многие процессы в организме: в том числе, на проницаемость стенок кровеносных сосудов; способствуют быстрому выселению иммунокомпетентных клеток в ткани; обеспечивают приток и стимулируют активность клеток, участвующих в воспалительных реакциях; усиливают иммунные реакции; инициируют и регулируют аллергические реакции.

Заключение

Проведённые эксперименты показали, что токсин, содержащийся в рыбе из оз. Котокельское в период вспышки АТПМ, является токсичным для экспериментальных белых мышей, вызывая обеднение селезёнки иммунокомпетентными клетками, и усиливает процесс деструкции эритроцитов.

Литература

1. Алиментарно-токсическая пароксизмальная миоглобинурия (АТПМ) : метод. рекомендации / Тюмен. гос. сельхоз. акад. – Тюмень, 2004. – 58 с.
2. Брыкова Т. С. Строение и функции селезёнки / Т. С. Брыкова, О. Д. Ягмуров // Морфология. – 1993. – Вып. 5–6. – С. 142–160.
3. Бурундукова Т. С. Условия и причины вспышки алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии в Тюменской области : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т. С. Бурундукова. – Тюмень, 2005. – 22 с.
4. Быков В. Л. Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток / В. Л. Быков // Морфология. – 1999. – Т. 115, вып. 2. – С. 64–72.
5. Клинико-морфологические исследования при алиментарно-токсической миоглобинурии / Л. Д. Сидорова [и др.] // Бюл. Сиб. отд-ния РАМН, 1985. – № 1. – С. 12–17.
6. Комарова Е. В. Структурные изменения в слизистой тонкого кишечника белых мышей, кормленных рыбой из оз. Котокельское в период вспышки гаффской болезни / Е. В. Комарова, Е. А. Смолина, С. В. Пронина // Всерос. конф. мол. ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» – Улан-Удэ, 2010. – С. 135–137.
7. Меркулов Г. А. Курс патологической техники / Г. А. Меркулов. – Л., 1969. – 423 с.
8. Митрофанова Т. С. Патологоанатомические изменения у мышей при гаффской болезни в условиях эксперимента / Т. С. Митрофанова // Современное состояние рыбководства на Урале и перспективы его развития. – Екатеринбург, 2003. – С. 243–247.
9. Морфометрический анализ популяции тучных клеток / Т. П. Линдер [и др.] // Архив патологии. – 1980. – Т. 42, № 6. – С. 60–64.
10. Паразитофауна окуня озера Котокельское (Республика Бурятия: Прибайкалье) в период вспышки гаффской болезни / Н. М. Пронин [и др.] // Вестн. Бурят. гос. ун-та. – 2010. – Вып. 4. – С. 174–179.
11. Патоморфологические изменения в тканях белых мышей при кормлении рыбой из оз. Котокельское в период вспышки гаффской болезни / С. В. Пронина [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 3 (73). – С. 256–259.
12. Поражение почек при алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии (Юксовско-Сартланской болезни) / Л. Д. Сидорова [и др.] // Терапевт. архив – 1985. – № 10. – С. 120–122.
13. Пронина С. В. Патоморфологические изменения в печени плотвы в природе и мышей в эксперименте: к этиологии вспышки Гаффской болезни в оз. Котокельское (Прибайкалье) / С. В. Пронина, Н. М. Пронин // Эколого-биологическое благополучие животного мира : материалы Междунар. науч.-практ. конф. (Благовещенск, 14–17 мая 2012 г.). – Благовещенск : ДальГАУ, 2012. – С. 273–276.
14. Струсевич А. В. Патологическая морфология сартланской (гаффской, юксовской) болезни : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. В. Струсевич. – Новосибирск, 1953. – 32 с.

Micromorphological changes in mice splenic tissue during the biological probe of fishes from Kotokel'skoe Lake

S. V. Pronina¹, N. M. Pronin²

¹Buryat State University, Ulan-Ude

²Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

Abstract. In the first time it is presented materials on pathohistological changes in the spleen of white mice during the influence of the toxin contained in the fish from Kotokel'skoe Lake in the period of Haff Disease epidemic.

Key words: spleen, lymphatic tissue, toxin, hemosiderin, lymphocyte, granulocyte, mast cells.

Пронина Светлана Васильевна
 Бурятский государственный университет
 672000. г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а
 доктор биологических наук, профессор
 тел. (3012) 44–55–03
 E-mail: SPronina06@mail.ru

Pronina Svetlana Vasilyevna
 Buryat State University
 24Smolina St., Ulan-Ude, 672000
 D.Sc. of Biology, Prof.
 phone: (3012) 44–55–03
 E-mail: SPronina06@mail.ru

Пронин Николай Мартемьянович
 Институт общей и экспериментальной
 биологии СО РАН
 670047, Улан-Удэ, Сахьяновой, 6
 доктор биологических наук
 заведующий лабораторией паразитологии
 и экологии гидробионтов
 тел. (3012)43–42–29
 E-mail: proninnm@yandex.ru

Pronin Nikolai Martemianovich
 Institute of General and Experimental
 Biology SB RAS
 6 Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047
 D. Sc. in Biology, Head of Laboratory
 of Parasitology and Ecology of Hydrobionts
 phone: (3012)43–42–29
 E-mail: proninnm@yandex.ru