

УДК 611.428: 616.1

## МОРФОЛОГИЯ ЛИМФОИДНЫХ СТРУКТУР ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ЖИВОТНЫХ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

В.В. Малашко, М.С. Малашко

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 01.06.2012 г.)

***Аннотация.** Изучены особенности морфологии лимфоидных структур тонкого кишечника 1-7-дневных телят и поросят. Полученные результаты подтверждают представления о том, что новорожденные животные обладают своеобразной и достаточно выраженной иммунологической реактивностью.*

***Summary.** The morphology of the lymphoid structures of the small intestine of 1-7-days-old calves and piglets has been studied. The results confirm the idea, that newborn animals have original and sufficiently expressed immunological reactivity.*

**Введение.** В развитии адаптивных реакций ключевую роль играют интегративные системы: нервная, эндокринная и иммунная. Наиболее крупным периферическим отделом иммунной системы является кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань. Иммунные структуры, ассоциированные со слизистой оболочкой кишечника (GALT – gut-associated lymphoid tissue), расцениваются как первый барьер, готовый оказать иммунную защиту в случае антигенного воздействия на слизистую оболочку [4, 5]. К особенностям иммунных структур тонкой кишки относят наличие агрегированных лимфоидных узелков [2, 8]. При этом эпителий рассматривается в качестве элемента микроокружения, интегрированного в лимфоидную ткань, которая погружена непосредственно в слизистую оболочку.

I. Jolli в 1953 г. расценивал присутствие лимфоцитов среди клеток эпителия как лимфоэпителиальный симбиоз и указывал на наличие положительного торпизма лимфоцитов к эпителиальному покрову [9]. В настоящее время иммунная система слизистых оболочек условно разде-

лена на 2 участка: индуктивный (пейеровы бляшки, региональные лимфатические узлы) и эффекторный (*Lamina propria*, слизистая оболочка).

Тонкий кишечник является основной зоной, где происходит sensibilization иммуноцитов, которые затем «оккупируют» другие слизистые оболочки и служат отправной точкой для циркуляции клеток между различными органами [6].

Лимфоидная ткань в стенке пищеварительного тракта существует в четырех очерченных анатомических зонах: 1) лимфоциты, расположенные базально между эпителиальными клетками слизистой оболочки, — интраэпителиальные лимфоциты; 2) лимфоциты, расположенные в соединительной ткани собственного слоя слизистой оболочки, — лимфоциты собственного слоя; 3) специфические скопления лимфоидных клеток в слизистой оболочке тонкой кишки, в частности, в тощей кишке, — Пейеровы бляшки; 4) солитарные лимфоидные фолликулы слизистой оболочки [13].

В обзоре по иммунологии кишечника R. Rabst [12] считает, что барьерную основу пищеварительного тракта составляют клетки, продуцирующие слизь, эндокринные клетки, специфические эпителиальные клетки (так называемые М-клетки, поглощающие антигены), различные субпопуляции лимфоцитов с их определенной локализацией в стенке кишки, макрофаги, лаброциты. Неспецифический иммунный ответ обеспечивается слизистыми клетками, гранулоцитами и макрофагами, специфический — различными лимфоидными клетками.

Данные М.Р. Сапина [7] показывают, что максимальное количество лимфоидных узелков в тонкой кишке достигает 2383-5135-10955. В стенках тонкой кишки, в разных ее отделах, на площади в 1 см<sup>2</sup> выявляется от 3 до 26 узелков. Самый низкий средний показатель плотности (3 узелка на площади в 1 см<sup>2</sup>) обнаруживается в стенках нижней части двенадцатиперстной кишки и начального отдела тощей кишки, самый высокий (в среднем 13 узелков на 1 см<sup>2</sup>) — в стенках дистального отдела подвздошной кишки [1, 3].

Вскоре после рождения плотность расположения лимфоидных узелков в стенках тонкой кишки быстро возрастает. Максимальное число лимфоидных узелков — от 7 до 16 на площади кишки в 1 см<sup>2</sup> обнаруживается у телят в первые 30 дней, у поросят — на 18-25 день после рождения [10, 11].

Как отмечает Т. Landsverk [10], у телят 3-недельного возраста можно выделить 2 типа пейеровых бляшек: в тощей кишке — тощий тип (1) и в подвздошной кишке — илеоцекальный тип (2). Бляшки 1 типа имеют хорошо развитую межфолликулярную ткань, много эндотелиальных венул, содержат лимфоциты и мононуклеарные клетки.

Фолликулы имеют грушевидную форму с выступающей короной – зоной малых лимфоцитов. В бляшках 2 типа межфолликулярная ткань занимает небольшую треугольную область и четко отделяется от фолликулов, которые имеют мешкообразную форму и содержат большое количество лимфобластов.

В современной литературе большое внимание уделяется состоянию иммунных структур при различных воздействиях (стресс и др.), однако по изучению variability этих структур у телят и поросят в раннем постнатальном онтогенезе данные отсутствуют. В частности, отсутствуют данные по сравнительной характеристике лимфоидных структур у телят и поросят в молозивно-молочный период и при переходе на фитотрофное питание.

В настоящее время показано, что пейеровы бляшки играют исключительную роль в иммунной системе желудочно-кишечного тракта. Для них характерна уникальная морфологическая структура – фолликулярно-ассоциированный эпителий, главной чертой которого является, так называемая, М-клетка. Эти клетки имеют короткие цитоплазматические отростки и образуют как бы интерэпителиальный карман, в котором помимо самой М-клетки, находятся макрофаги, диндритные клетки, Т- и В-лимфоциты.

Несмотря на сложную организацию и совершенство защитных механизмов слизистых оболочек пищеварительного тракта, бактериальные и вирусные патогены нередко успешно преодолевают все барьеры, проникают во внутреннюю среду организма и вызывают заболевания у животных. Поэтому изучение местного иммунитета слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта животных на ранних этапах постнатального онтогенеза имеет важное научное и практическое значение.

**Цель работы.** Изучить формирование и морфологические особенности иммунной системы слизистых оболочек тонкого кишечника телят и поросят в раннем постнатальном периоде онтогенеза.

**Материал и методика исследований.** От новорожденных и 7-дневных телят, а также от новорожденных и 7-дневных поросят забирался участки тощей кишки (длиной около 1,0-2,0 см) строго в одних и тех же местах – напротив брыжеечных лимфатических узлов, между ветвями брыжеечной артерии.

Исследовались образцы ткани на участках, соответствующих 6-8% (проксимальный отдел тощей кишки), 32-37% (средний участок тощей кишки), 65-70% (дистальный участок тощей кишки) длины тонкого кишечника телят и поросят. Биоптаты тонкого кишечника фиксировали в 10%-12%-ом нейтральном забуференном формалином по Р. Лилли при  $t+4^{\circ}\text{C}$  и  $t+20^{\circ}\text{C}$ , жидкости И. Карнуа, фиксаторе ФСУ

А.М. Бродского, 70° спирте. При заборе материала стремились к максимальной стандартизации препаративных процедур при фиксации, проводке и заливке, приготовлении криостатных и парафиновых срезов. После вскрытия брюшной полости отбор проб тонкого кишечника проходил не позднее 10-15 мин после эктаназии.

Для получения обзорной информации структурных компонентов тонкого кишечника гистосрезы окрашивали гематоксилин-эозином по П. Эрлиху, прочным зеленым по И. Ван Гизону, Маллори, эозином-метиленовым синим по Лейшману, альциновым синим с докраской ядер гематоксилином. Определение плазмочитов проводили по методу Ж. Браше.

Подсчет межэпителиальных лимфоцитов проводили в 10 полях зрения микроскопа в расчете на 1000 поверхностных эпителиоцитов ворсинок. Подсчет плазмочитов проводился в 10 полях зрения микроскопа. Плазмочиты отличали от других клеток по эксцентрично расположенному ядру и бледно окрашенному участку, расположенному вокруг ядра, так называемая «перинуклеарная зона просветления» или «светлый дворик».

Пробы тонкого кишечника пропитывали парафином в термостате ТВЗ-25 при  $t+54^{\circ}\text{C}$  — 1,5-4 часа. Срезы готовили на ротационном микротоме МПС-2 и МС-2 толщиной — 5-8 мкм. Из нефиксированной ткани гистосрезы готовили на микротоме-криостате МК-25 толщиной 8-10 мкм. Гистосрезы монтировали на предметных стеклах Ц1923. Для дегидрирования срезов использовали калибровочные спиртовые растворы. Статистический анализ результатов проводили с использованием  $t$  критерия Стьюдента и дисперсионного анализа (ANOVA). Для проверки статистических гипотез при малых выборках применяли непараметрический Z-критерий.

**Результаты исследований и их обсуждение.** У новорожденных животных телят и поросят лимфоидные узелки распределены равномерно в слизистой оболочке тощей кишки. Основания лимфоидных узелков лежат в подслизистой основе, а их кунол обращен в сторону просвета кишки и располагается в собственной пластинке слизистой оболочки. Известно, что при активации иммунных структур происходит резкое увеличение числа лимфоидных узелков, имеющих герминативные центры. Их появление отражает процесс пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов и ряда других иммунокомпетентных клеток.

Считается, что в герминативных центрах осуществляется дифференциация лимфоцитов или, так называемая «клональная селекция», приводящая к появлению клеток, синтезирующих иммуноглобулины наиболее подходящей структурой антигенсвязывающего участка.

существенные изменения в морфологии лимфоидных узелков происходят в период молозивного питания телят и поросят.

Гистологический анализ светлых центров показал, что в них содержатся средние и большие лимфоциты с базофильной цитоплазмой. Центры окружены, главным образом, малыми лимфоцитами. В светлых центрах встречаются макрофаги, фагоцитирующие погибающие клетки-лимфоциты, плазмочиты. Плазмочиты располагаются, главным образом, в средних отделах светлых центров.

До приема первой порции молозива у телят количество лимфоидных узелков с герминативными (светлыми) центрами в тощей кишке составляло 0,5-0,7%, то на 7 день их число увеличилось до 34,8-49,3%. Площадь, занимаемая герминативными центрами лимфоидных узелков, у новорожденных телят достигала  $0,43 \pm 0,06$  мкм<sup>2</sup>, к 7-дневному возрасту этот показатель увеличился до  $1,04 \pm 0,08$  мкм<sup>2</sup> (в 2,4 раза,  $P < 0,01$ ). Следовательно, своевременная выпойка молозива способствует активной пролиферации и дифференцировке клеток, например, В-клеток.

В частности, обязательная выпойка молозива ускоряет развитие кишечника, т.к. в молозиве содержится «фактор роста слизистой оболочки» и тем самым уменьшается пенетрация антигенов в кровь. Активное развитие светлых центров связано с антигенной нагрузкой на организм и его нормальной микрофлорой. Появление единичных светлых центров в лимфоидных узелках плодов телят и поросят и новорожденных связано с поступлением антигенов из крови матери.

Наряду с увеличением количества узелков, линейных параметров, плотности расположения клеток, отчетливо различаются структурно-функциональные зоны: герминативная, узелковая, околоузелковая и купол.

Куполообразное выпячивание в просвет кишки становится более значительным, эпителий инфильтрирован многочисленными лимфоцитами, мигрировавшими из зоны купола через базальную мембрану. В куполе узелков находятся макрофаги, чаще окруженные лимфоцитами.

Размеры лимфоидных узелков тощей кишки у новорожденных телят составляли от  $2,21 \pm 0,11 \times 2,46 \pm 0,23$  мм до  $4,37 \pm 0,54 \times 3,17 \pm 0,40$  мм. На 7 день исследований размеры узелков увеличились до  $5,16 \pm 0,78 \times 4,27 \pm 0,28 - 6,44 \pm 0,32 \times 5,04 \pm 0,46$  мм. В таблице 1 представлен цитологический состав одиночных лимфоидных узелков без герминативных центров тощей кишки телят, в таблице 2 — с герминативными центрами.

На протяжении 7-дневного возраста количество больших лимфоцитов увеличилось на 87,2% ( $P < 0,05$ ), наблюдается тенденция в сторону повышения содержания средних и малых лимфоцитов. Установлено достоверное повышение концентрации в лимфоидных узелках плазмочитов на 75,4% ( $P < 0,05$ ) и тучных клеток — на 32,0% ( $P < 0,01$ ).

Таблица 1 – Цитологический состав одиночных лимфоидных узелков без герминативных центров тощей кишки телят, %

Тип клеток	Возраст, дни	
	новорожденные	7
Большие лимфоциты	4,23±1,31	7,92±2,05 <sup>***</sup>
Средние лимфоциты	18,37±4,25	28,73±5,48 <sup>**</sup>
Малые лимфоциты	77,40±6,58	63,35±6,82 <sup>**</sup>
Плазмоциты	1,26±0,03	2,21±0,08 <sup>**</sup>
Макрофаги	2,27±0,05	2,48±0,07 <sup>**</sup>
Тучные клетки	0,25±0,004	0,33±0,006 <sup>***</sup>

<sup>\*</sup>P<0,05; <sup>\*\*</sup>P<0,01; н/д – недостоверно

В лимфоидных узелках со светлыми (герминативными) центрами наблюдается следующая динамика изменения концентрации клеточного состава (таблица 2). На протяжении 7-дневного возраста содержание больших лимфоцитов возросло на 70,0% (P<0,05), одновременно достоверно увеличилась концентрация средних лимфоцитов – в 2,1 раза, но уменьшилось количество малых лимфоцитов – в 2,4 раза по отношению к периоду новорожденности. Отмечается определенная тенденция в возрастании количества плазмоцитов, макрофагов и тучных клеток.

Таблица 2 – Цитологический состав одиночных лимфоидных узелков с герминативными центрами тощей кишки телят, %

Тип клеток	Возраст, дни	
	новорожденные	7
Большие лимфоциты	9,23±2,73	24,92±5,05 <sup>**</sup>
Средние лимфоциты	23,17±3,63	46,73±4,48 <sup>**</sup>
Малые лимфоциты	67,60±8,58	28,35±2,82 <sup>***</sup>
Плазмоциты	3,26±1,03	7,21±2,42 <sup>**</sup>
Макрофаги	3,77±1,15	5,49±2,28 <sup>**</sup>
Тучные клетки	1,85±0,41	3,33±0,93 <sup>**</sup>

<sup>\*</sup>P<0,05; <sup>\*\*</sup>P<0,01; н/д – недостоверно

Возрастание числа средних и больших лимфоцитов и усиление в них биосинтетических процессов свидетельствует об активации иммунокомпетентных клеток.

Биологической особенностью новорожденных поросят является то, что в течение всего подсосного периода наблюдается самый большой относительный рост поросенка, что естественно сказывается на морфофизиологических и иммунологических перестройках пищеварительного тракта. Существенное влияние до 4-недельного возраста на функционирование тонкого кишечника оказывает молоко свиноматки, а с 5-недельного возраста преобладающее влияние оказывает подкормка.

В той связи выявлены некоторые иммунологические особенности в функционировании тонкого кишечника поросят по сравнению с телятами. Например, у телят процессы роста преобладают от 7-8-месяч-

ного до 16-18-месячного возраста, тогда как от рождения до 6-7 месяцев и с 16-18 до 25-30 месяцев наблюдаются значительные качественные изменения, связанные с перестройкой систем пищеварения, развитием половой системы, плодоношением и лактацией.

Скопления лимфоидных узелков в тощей кишке локализуются более плотно, встречаются бляшки четырехугольной и даже звездчатой формы с относительно длинными отростками – лучами.

Площадь герминативных центров по сравнению с таковыми у телят несколько меньше и достигает от  $0,32 \pm 0,08$  мкм<sup>2</sup> у новорожденных до  $0,96 \pm 0,03$  мкм<sup>2</sup> – у 7-дневных поросят. Количество лимфоидных узелков в отдельных пейеровых бляшках составляла  $4,23 \pm 0,45$  –  $14,06 \pm 1,46$ , что в среднем превышало данный показатель у телят на 7,6-10,2% ( $P < 0,05$ ). У поросят 7-дневного возраста лимфоидные узелки занимают 45,4% площади бляшки, на долю диффузной лимфоидной ткани приходится 28,4%, остальное (26,2%) занимает соединительная ткань.

Анализ данных таблицы 3 свидетельствует, что содержание больших лимфоцитов за 7-дневный период увеличилось на 48,8%, средних лимфоцитов – на 73,1% при уменьшении доли малых лимфоцитов – на 41,8% ( $P < 0,05$ ). Концентрация тучных клеток возросла в 2,1 раза.

Таблица 3 – Цитологический состав одиночных лимфоидных узелков с герминативными центрами тощей кишки поросят, %

Тип клеток	Возраст, дни	
	новорожденные	7
Большие лимфоциты	$4,18 \pm 1,05$	$6,22 \pm 2,03^{**}$
Средние лимфоциты	$33,11 \pm 4,23$	$57,31 \pm 5,26^{**}$
Малые лимфоциты	$62,71 \pm 6,29$	$36,47 \pm 3,82^{**}$
Плазмоциты	$5,26 \pm 2,44$	$8,18 \pm 3,61^{**}$
Макрофаги	$1,65 \pm 0,78$	$3,74 \pm 1,82^{**}$
Тучные клетки	$1,38 \pm 0,4$	$2,85 \pm 0,12^{**}$

<sup>\*</sup> $P < 0,05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0,01$ ; н/д – недостоверно

Увеличение числа средних лимфоцитов может быть связано с тем, что часть малых лимфоцитов превращается в средние, т.е. интенсифицируются процессы дифференцировки лимфоидных клеток, увеличивается количество средних лимфоцитов, выходящих в G<sub>0</sub> или G<sub>1</sub>-период клеточного цикла.

В этот возрастной период увеличивается антигенная нагрузка на организм телят и поросят. Поступление бактерий в стенку кишки приводит к активизации клеток иммунной системы – лимфоцитов. Многие из них увеличиваются в размерах на 18-27,5% ( $P < 0,05$ ) и образуют на своей поверхности цитоплазматические отростки (рис.).

Часть активированных лимфоцитов (до 38%) из пейеровых бляшек мигрируют в эпителиальный слой тощей кишки и локализуются в

межклеточных щелях между энтероцитами. Другая часть этой категории клеток (до 12-18%) трансформируется в плазмоциты, которые рассеиваются в разных областях собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основе тощей кишки, тем самым создавая эффективный иммунный барьер.



Рисунок – Активированные лимфоциты пейеровых бляшек тощей кишки поросенка с цитоплазматическими отростками. Электронограмма. Ув.: 20000.

Полученные результаты подтверждают представления о том, что новорожденные животные обладают своеобразной и достаточно выраженной иммунологической реактивностью.

**Заключение.** Тонкая кишка к моменту рождения телят и поросят характеризуется недостаточностью развития ряда функций. В настоящее время активные исследования ведутся в трех направлениях: изучение степени проницаемости кишечного барьера, роли лингвальной и молочной липаз в процесс усвоения жиров у новорожденных и появление кишечной микрофлоры. При своевременной выпойке молозива в течение 1-4 дней доминирующим микроорганизмом в кишечнике становится *Lactobacillus bifidus*, к тому же молозиво и молоко содержит несколько факторов, стимулирующих рост этого микроорганизма и предупреждающих нежелательный рост патогенной микрофлоры. Отмеченные биохимические и физиологические изменения естественным



образом сказываются на дифференцировке и функционирование иммунной системы слизистых оболочек пищеварительного тракта.

После перехода на окончательный тип питания генетически детерминированное становление иммунной системы слизистых оболочки тонкого кишечника, находящегося на границе раздела внешней и внутренней среды организма, взаимодействуя, с одной стороны, с содержимым просвета кишки, с другой – с собственной пластинкой, непрерывно дренируемой жидкой частью крови, лейкоцитами и соединительнотканными клетками собственной пластинки ее слизистой оболочки, под влиянием нервных, эндокринных и иммунных сигналов оптимально регулирует пищеварение, всасывание и постоянство внутренней среды при соблюдении санитарно-гигиенических условий выпадания телят и поросят.

Изучение механизмов местного иммунитета и его становление в раннем постнатальном онтогенезе будет способствовать разработке и совершенствованию средств специфической профилактики многих инфекционных заболеваний животных. Тот факт, что иммунный статус слизистых оболочек определяется главным образом локальным содержанием специфических IgA, указывает на необходимость разработки средств профилактики желудочно-кишечных заболеваний с учетом этой особенности местного иммунитета.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Батуев, К. М. Морфология лимфоидных фолликулов тонкой кишки человека /К. М. Батуев //Тр. Пермск. мед. ин – та. -1971. –Т.106. –С. 53-57.
2. Коплик, Е. В. Морфологические особенности лимфоэпителиальных структур тощей кишки у крыс после стрессового воздействия /Е. В. Коплик, Е. А. Иванова //Бюл. эксперим. биол. и мед. -2012. –Т.153, №5. –С 755-758.
3. Корнеева, Е. А. Введение в иммунофизиологию /Е. А. Корнеева. –Спб., 2003. –117с.
4. Лебедев, К. А. Иммунология образ распознающих рецепторов (интегральная иммунология) /К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. –М., 2009. –185с.
5. Робинсон, А. Основы медицинской иммунологии /А. Робинсон, А. Ройт, П. Делвз. –М., 2006. –204с.
6. Рой, Г. Ш. Иммунные механизмы тонкой кишки /Г. Ш. Рой, Т. Б. Томаш //Гастроэнтерология. –М.: Медицина, 1988. –Ч.2. –С. 85-89.
7. Салин, М. Р. Анатомия органов иммунной системы /М. Р. Салин //Функциональная морфология иммунной системы. –Новосибирск: Наука, 1987. –С. 16-59.
8. Салин, М. Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит /М. Р. Салин, Д. Б. Никитюк. –М.: Наука, 2000. –178с.
9. Bienenstock, P. Mucosal immunology /P. Bienenstock, A. D. Befus //Immunology. -1980. –Vol.41. –P. 249-270.
10. Landsverk, T. Is the ileo-caecal Peyer's patch in ruminants a mammalian "bursa-equivalent"? //Acta pathol. microbiol. et immunol. scand. -1984. –A92, N1. –P. 77-79.
11. Marsh, M. N. Studies of intestinal lymphoid tissue /M. N. Marsh //Gut (British Medical Association). -2005. –Vol.16, NS. –P. 665-682.

12. Rabst, R. The anatomical basis for the immune function of the gut //R. Rabst //Anat. and Embriol. -1987. -Vol.176, N2. -P. 135-144. 13. Seeling, L. Intraepithelial lymphocytes // Seeling, R. E. Billingham //J. of Investigative Dermatology. -1997. -Vol.56. -P. 371-392.