

© А. Ш. Иргашев, З. К. Каландарова, К. С. Арбаев, М. Райнахер, 2017
УДК 611.018.24-053:636.4

А. Ш. Иргашев¹, З. К. Каландарова¹, К. С. Арбаев¹, М. Райнахер²

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С КОНЪЮНКТИВОЙ, У СВИНЕЙ

¹ Кафедра ветеринарно-санитарной экспертизы, гистологии и патологии (зав. — канд. вет. наук Б. С. Ажыбеков), Кыргызский национальный аграрный университет им. К. И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика; ² Институт ветеринарной патологии, Университет Юстуса-Либиха, г. Гиссен, Германия

Цель — исследование структуры и клеточного состава лимфоидной ткани, ассоциированной с конъюнктивой (ЛТАК), у свиней в возрастном аспекте.

Материал и методы. Конъюнктиву нижних и верхних век изучали у 18 поросят и свиней обоего пола в возрасте 5–7 сут, 2, 6 и 12 мес. Использовали гистологические, гистохимические и иммуногистохимические методы для выявления структурных изменений, а также маркера Т-лимфоцитов (CD3), В-лимфоцитов (CD79a) ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA).

Результаты. У 5–7-дневных поросят в конъюнктиве бокаловидные клетки слабо развиты, и ЛТАК представлена единичными лимфоцитами; лимфоидные узелки отсутствуют. У поросят 2-месячного возраста в конъюнктиве бокаловидные клетки хорошо развиты, а ЛТАК содержала диффузные скопления лимфоцитов и плазматических клеток. У свиней 6- и 12-месячного возраста ЛТАК содержала лимфоциты, плазматические клетки и лимфоидные узелки. В истонченных участках конъюнктивы, покрывающих лимфоидные узелки, бокаловидные клетки единичны или отсутствуют. Иммуногистохимические исследования показали, что ЛТАК у 5–7-дневных поросят содержала только Т-лимфоциты. В остальных группах она содержала как Т-, так и В-лимфоциты. Лимфоидные узелки представлены В-лимфоцитами, Т-лимфоциты в основном расположены в межузелковых зонах ЛТАК. В герминативных центрах лимфоидных узелков выявлена пролиферация лимфобластов.

Выводы. Полученные морфологические данные говорят о наличии в паракриальных тканях свиней иммунной системы в виде ЛТАК, содержащей лимфоидные клетки и структуры, необходимые для формирования иммунной реакции на поверхности глаз и в паракриальных тканях.

Ключевые слова: лимфоидная ткань, ассоциированная с конъюнктивой, гистологическая структура, иммуногистохимия, свиньи

Лимфоидная ткань, ассоциированная с конъюнктивой (ЛТАК), сходна с лимфоидной тканью пищеварительного тракта и бронхов [9, 10]. Она лучше исследована у человека и кролика [6–8], чем у других видов. У человека она содержит все компоненты, необходимые для выработки полноценного иммунного ответа [6, 7, 10]. Сравнительное гистологическое исследование конъюнктивы у 15 видов млекопитающих установило наличие в ней лимфоидных узелков у кроликов, хорьков, морских свинок, кошек, собак, свиней, овец, коров, макаков-резусов, бабуинов и людей, причем их количество зависело от вида животного. В конъюнктиве у мышей и крыс лимфоидная ткань обнаружена не была [3]. У мышей она имела только в мигательной перепонке [10]. При исследовании ЛТАК иммуногистохимиче-

скими методами в ней обнаружены IgA-, а также в небольшом количестве — IgM-позитивные плазматические клетки [7]. В настоящее время отсутствуют исследования, посвященные морфологическим изменениям ЛТАК в зависимости от возраста животных.

Цель настоящей работы — исследование структуры ЛТАК у свиней и выявление в ней популяций лимфоцитов, а также бластных клеток в возрастном аспекте.

Материал и методы. Материал для исследования брали во время забоя поросят и свиней в убойном пункте, расположенном недалеко от г. Бишкек. После забоя 18 голов поросят и свиней все их органы были подвергнуты детальному осмотру для исключения каких-либо патологических изменений. Объектами исследования служили конъюнктивы нижних и верхних век глаз 18 голов поросят и свиней круп-

Сведения об авторах:

Иргашев Алмазбек Шукурбаевич (e-mail: irgasheva@mail.ru), Каландарова Закия Кабылбаевна (e-mail: zakiaoph@mail.ru), Арбаев Кубан Султанович, кафедра ветеринарно-санитарной экспертизы, гистологии и патологии, Кыргызский национальный аграрный университет им. К. И. Скрябина, 720005, Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. Медерова, 68

Райнахер Манфред (e-mail: manfred.reinacher@vetmed.uni-giessen.de), Институт ветеринарной патологии, Университет Юстуса-Либиха, 35392, Германия, г. Гиссен, ул. Франкфуртер, 96

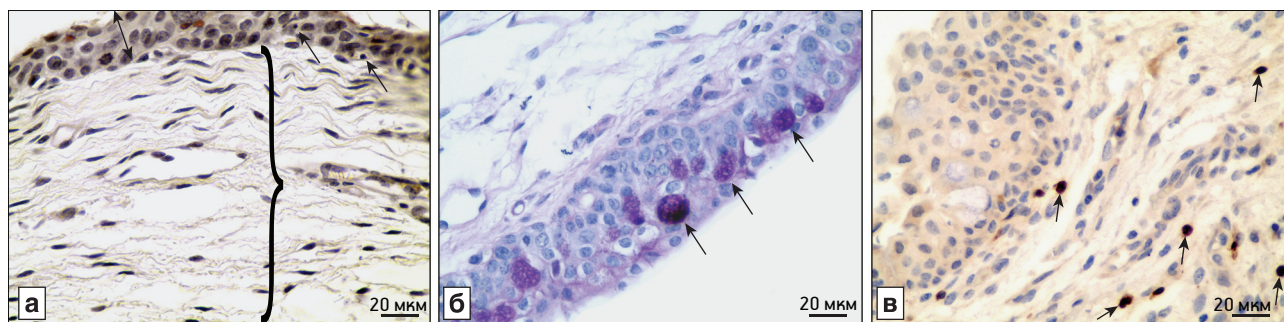


Рис. 1. Конъюнктива глаза 5-суточного поросенка.

а — эпителиальный слой (двусторонняя стрелка) и субэпителиальный слой конъюнктивы (фигурная скобка). Единичные лимфоциты (стрелки); б — бокаловидные клетки (стрелки); в — CD3-позитивные клетки (Т-лимфоциты) в субэпителиальном слое конъюнктивы (стрелки). а — окраска гематоксилином — эозином; б — ШИК-реакция. Дополнительная окраска красителем Папаниколау; в — пероксидазно-антипероксидазный метод с докраской гематоксилином

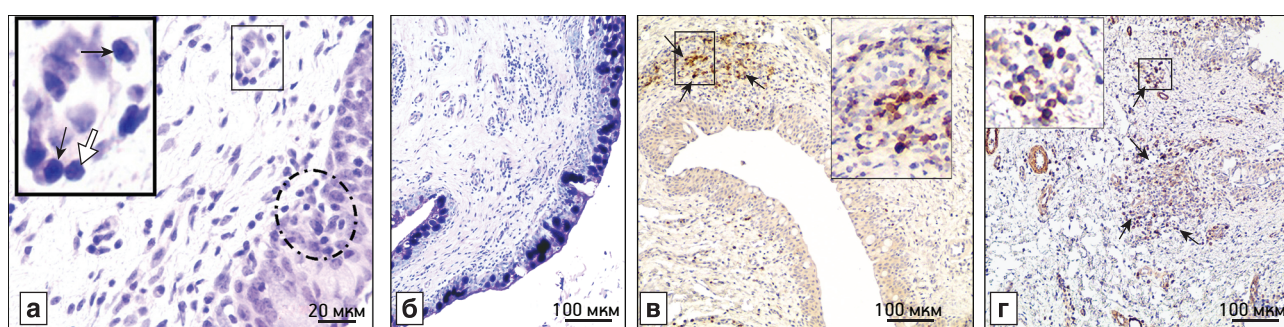
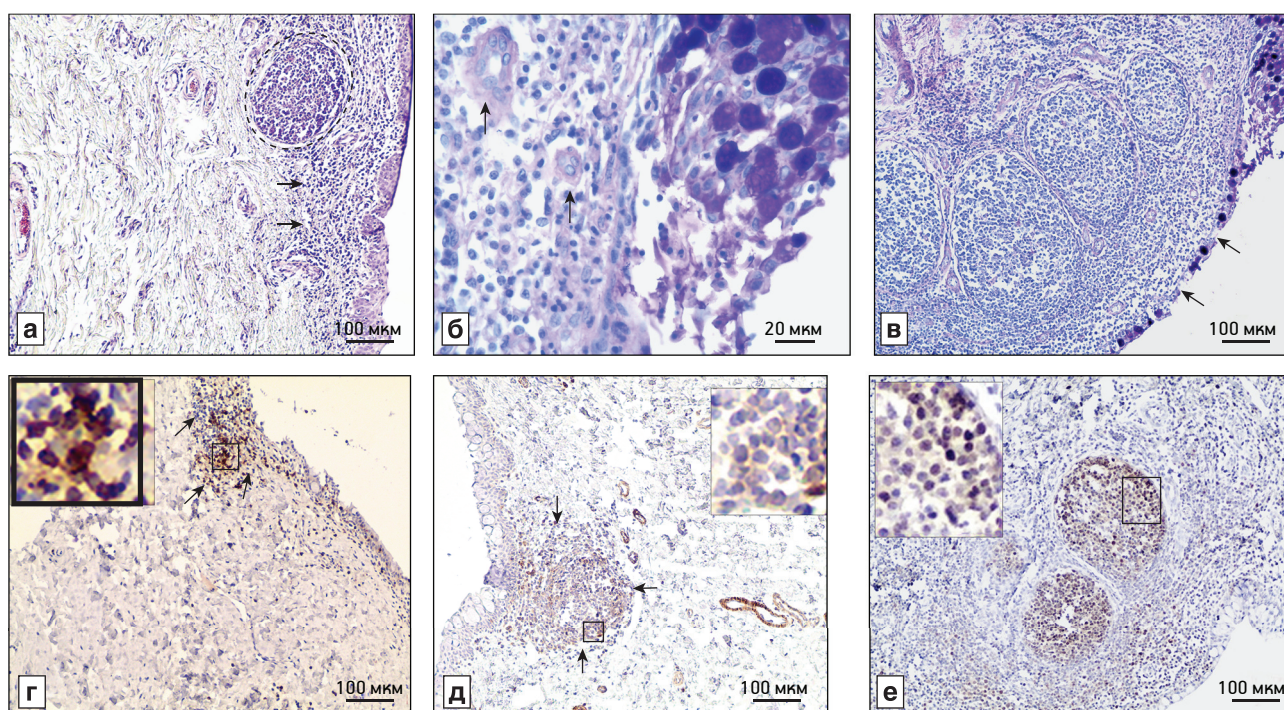


Рис. 2. Конъюнктива глаз 2-месячного поросенка.

а — лимфоциты и плазматические клетки в субэпителиальном слое и вокруг сосудов. В левом верхнем углу внутри прямоугольника участок при большом увеличении. Вокруг сосуда лимфоцит (белая стрелка) и плазматические клетки (черные стрелки); в эпителиальном слое (внутри круга) интраэпителиальные лимфоциты; б — бокаловидные клетки (сине-фиолетового цвета); в — скопление CD3-позитивных клеток (Т-лимфоциты) вокруг сосуда субэпителиального слоя конъюнктивы (стрелки). В правом верхнем углу при большом увеличении участок внутри прямоугольника; г — небольшое скопление CD79a-позитивных клеток (В-лимфоциты) (стрелки) в субэпителиальном слое конъюнктивы. В левом верхнем углу при большом увеличении участок, очерченный прямоугольником. а — окраска гематоксилином — эозином; б — ШИК-реакция с дополнительной окраской по Папаниколау; в — пероксидазно-антипероксидазный метод с докраской гематоксилином; г — метод с использованием авидин-биотиновых комплексов с докраской гематоксилином



ной белой породы, в том числе 3 головы — 5–7-суточные поросята (все самки), 3 головы — 2-месячные поросята (2 самца, 1 самка), 6 голов — 6-месячные подвинки (4 самки, 2 самца) и 6 голов — 12-месячные свиньи (4 самки, 2 самца). При взятии материала соблюдали общепринятые требования международной Хельсинкской декларации о гуманном отношении к подопытным животным. Сбор материала и часть гистологических исследований проведены на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы, гистологии и патологии Кыргызского национального аграрного университета им. К.И.Скрябина, а часть гистологических, гистохимических и иммуногистохимических исследований — в Институте ветеринарной патологии факультета ветеринарной медицины Гиссенского университета им. Юстуса Либиха (Германия) при грантовой поддержке ДААД (Германская Служба Академических Обменов). Верхние и нижние веки глаз поросят и свиней сразу же после забоя и осмотра фиксировали в 4% водном растворе нейтрального формалина, после чего заливали в парафин обычным способом. Готовили серийные срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме RM 2255 (Leica Biosystems Nussloch, Германия). Гистологические препараты окрашивали гематоксилином — эозином и ставили ШИК-реакцию для выявления бокаловидных клеток и докрашивали красителем Папаниколау (1:10).

Для выявления Т-, В-лимфоцитов и оценки пролиферации клеток использовали иммуногистохимические реакции. Применяли следующие первичные антитела и стандартные иммуногистохимические методы: поликлональные кроличьи антитела к маркеру Т-лимфоцитов CD3 (DakoCytomation, Дания); моноклональные мышьиные антитела к маркеру В-лимфоцитов CD79a — очищенные (Acris Antibodies GmbH, Германия); моноклональные мышьиные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) (DakoCytomation, Дания).

Для визуализации реакций применяли: 1) АВС-метод — с использованием авидин-биотин-комплекс; 2) пероксидазно-антипероксидазный (ПАП) метод с 3,3'-диамино-бензидин-тетрагидрохлорид дигидратом (ДАБ) (Fluka, Германия). В ходе проведения иммуногистохимических реакций параллельно осуществляли отрицательные контроли. Иммуногистохимические исследования проводили согласно протоколам фирм-производителей с применением специального планшета Coverplates, Shandon Racks, Thermo Scientific (Германия), предназначенного для ручного иммуногистохимического окрашивания. При положительной реакции CD3-позитивные клетки (Т-лимфоциты), CD79a-позитивные клетки (В-лимфоциты), клетки в состоянии пролиферации окрашивались в коричневый цвет. После проведения иммуногистохимических реакций срезы докрашива-

ли гематоксилином. Препараты просматривали под бинокулярным микроскопом Nikon ECLIPSE 80 i с экраном (Nikon, Германия).

Результаты исследования. Конъюнктивы у 5–7-суточных поросят состоит из эпителиального и субэпителиального слоев (рис. 1, а). Эпителиальный слой представлен многослойным эпителием, состоящим из эпителиоцитов цилиндрической и кубической формы, а также бокаловидными клетками (см. рис. 1, б). Единичные лимфоциты встречаются между эпителиоцитами и в субэпителиальной соединительной ткани (см. рис. 1, а). Вокруг отдельных сосудов субэпителиального слоя и в их просвете встречаются единичные лимфоциты. Лимфоидные узелки в субэпителиальной соединительной ткани конъюнктивы отсутствуют. Иммуногистохимические исследования показали, что единичные CD3-позитивные лимфоциты располагаются в субэпителиальном слое, вокруг и в просвете отдельных сосудов и между эпителиоцитами конъюнктивы (см. рис. 1, в), тогда как CD79a-позитивные лимфоциты отсутствуют.

У 2-месячных поросят незначительное количество лимфоидной ткани наблюдается в основном в тарзальной зоне конъюнктивы верхних и нижних век, а в своде и бульбарной зоне конъюнктивы лимфоидной ткани нет. В субэпителиальной соединительной ткани встречаются лимфоциты и плазматические клетки. Вокруг отдельных сосудов отмечается небольшое скопление лимфоцитов и плазматических клеток. Встречаются интраэпителиальные лимфоциты (рис. 2, а). Бокаловидных клеток в конъюнктиве у 2-месячных поросят больше, чем у 5–7-суточных поросят (см. рис. 2, б).

Иммуногистохимические исследования показали, что популяция лимфоцитов в конъюнктиве у 2-месячных поросят представлена CD3-позитивными лимфоцитами (см. рис. 2, в) и CD79a-позитивными лимфоцитами (см. рис. 2, г). Вокруг отдельных сосудов субэпителиального слоя отмечается небольшое скопле-

Рис. 3. Конъюнктура 6-месячной (а–в, д, е) и 12-месячной (г) свиньи.

а — типичный лимфоидный узелок (внутри круга), расположенный в субэпителиальной соединительной ткани; лимфоидные клетки в субэпителиальном слое и вокруг сосудов (стрелки); б — венулы с высоким эндотелием (стрелки) в субэпителиальном слое конъюнктивы; в — в субэпителиальном слое 4 лимфоидных узелка различных размеров, в этом месте эпителий истончен; бокаловидных клеток мало, в отдельных местах они отсутствуют (стрелки); г — CD3-позитивные клетки (Т-лимфоциты) в субэпителиальном слое конъюнктивы и вокруг незначительного размера лимфоидного узелка (стрелки); в левом верхнем углу большое увеличение участка, очерченного прямоугольником. CD3-позитивные клетки контактируют с эпителием конъюнктивы; д — лимфоидный узелок в субэпителиальном слое конъюнктивы, состоящий из CD79a-позитивных клеток (В-лимфоциты) (стрелки) и имеющий контакт с эпителием конъюнктивы; в правом верхнем углу большое увеличение участка, очерченного прямоугольником; е — в лимфоидном узелке клетки в состоянии пролиферации окрашены коричневым цветом, в левом верхнем углу большое увеличение участка, очерченного прямоугольником. а — окраска гематоксилином — эозином; б, в — ШИК-реакция с дополнительной окраской по Папаниколау; г, е — пероксидазно-антипероксидазный метод с докраской гематоксилином; д — метод с использованием авидин-биотин-комплексов и докраской гематоксилином

ние CD3-позитивных лимфоцитов (см. рис. 2, в). Интраэпителиальные лимфоциты представлены CD3-позитивными клетками.

У свиней 6- и 12-месячного возраста субэпителиальная ткань конъюнктивы содержит как лимфоциты и плазматические клетки, так и типичные лимфоидные узелки (рис. 3, а), которые в основном располагаются в тарзальной зоне конъюнктивы верхних и нижних век, а в своде и бульбарной зоне конъюнктивы имеется незначительное количество лимфоидных узелков или они единичны. В субэпителиальном слое конъюнктивы лимфоидные узелки обычно единичны, но они могут располагаться и в виде мелких групп (обычно по 2–3) (см. рис. 3, в). Отдельные лимфоидные узелки содержат центр размножения. Лимфоидные узелки и лимфоидные клетки тесно взаимосвязаны с эпителием конъюнктивы, где создают ЛТАК (см. рис. 3, а). В субэпителиальном слое конъюнктивы и вокруг лимфоидных узелков встречаются венулы с высоким эндотелием, вокруг которых выявляются лимфоциты (см. рис. 3, б). В участках конъюнктивы, где под эпителием располагаются лимфоидные узелки, он истончен и инфильтрирован лимфоцитами, а количество бокаловидных клеток уменьшено, либо они отсутствуют (см. рис. 3, в).

Иммуногистохимические исследования показали, что субэпителиальная ткань содержит как CD3-позитивные (см. рис. 3, г), так и CD79a-позитивные лимфоциты, из которых в основном состоят лимфоидные узелки (см. рис. 3, д). В центре размножения отдельных лимфоидных узелков отмечена пролиферация лимфобластов (см. рис. 3, е). Большинство CD3-позитивных лимфоцитов располагаются вокруг лимфоидных узелков (см. рис. 3, г) или в межузелковых зонах. ЛТАК имеет В-зависимые зоны (лимфоидные узелки), состоящие из CD79a-позитивных лимфоцитов, и Т-зависимые зоны, расположенные вокруг лимфоидных узелков, или межузелковые зоны, состоящие из CD3-позитивных лимфоцитов.

Обсуждение полученных данных. ЛТАК у свиней имеет такое же строение, как лимфоидная ткань, ассоциированная с другими слизистыми оболочками организма [9]. Для нее характерна специфическая структура, которая представлена конъюнктивальным эпителием, лимфоидными узелками и клетками в субэпителиальном слое. Проведенные морфологические исследования показали, что указанные структуры ЛТАК тесно взаимосвязаны между собой. Эта структура у свиней морфологически и по рас-

положению имеет сходство с ЛТАК у человека [6, 7] и различных видов животных [2, 3, 5, 8, 10]. Ранее было показано, что в конъюнктиве у свиней имеются лимфоидные узелки [3]. Нами впервые исследована структура ЛТАК у свиней и описаны возрастные изменения в ней. Гистологически ЛТАК у поросят в возрасте 5–7 сут морфологически сходна с таковой у новорожденных кроликов и индеек [4].

Используя иммуногистохимические методы, нами впервые у поросят и свиней исследованы популяция лимфоцитов и пролиферация лимфобластов в ЛТАК в возрастном аспекте. Первичные антитела к маркерам CD3, CD79a и PCNA, соответственно, дали положительные реакции с Т-, В-лимфоцитами и бластными клетками. ЛТАК у свиней содержала CD3-позитивные лимфоциты, CD79a-позитивные лимфоциты, но в возрасте 5–7 сут CD79a-позитивные лимфоциты отсутствовали. В центрах размножения лимфоидных узелков ЛТАК была отмечена пролиферация лимфобластных клеток. Аналогичные иммуногистохимические исследования, направленные на выявление Т- и В-лимфоцитов в ЛТАК с применением соответствующих первичных поли- и моноклональных антител, были проведены у человека [6–8], кошек [5, 6], грызунов [1] и бабуинов [2]. Места расположения Т- и В-лимфоцитов в ЛТАК у свиней аналогичны таковым у отмеченных выше видов. Таким образом, совокупность полученных результатов морфологического исследования ЛТАК у свиней позволяет заключить: 1) ЛТАК у свиней в целом имеет структуру, подобную лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками у животных. Также ей свойственна специфическая структура, включающая в себя лимфоидные клетки и узелки, которые ассоциированы с конъюнктивальным эпителием; 2) у новорожденных поросят ЛТАК слабо развита и представлена единичными лимфоцитами. В процессе роста и развития поросят идет поэтапное формирование ЛТАК, которое характеризуется постепенным увеличением количества лимфоидных клеток и их скоплением, а также образованием лимфоидных узелков; 3) ЛТАК у свиней содержит Т- и В-лимфоциты, тогда как в ЛТАК у поросят в возрасте 5–7 сут В-лимфоциты отсутствуют. В центрах размножения лимфоидных узелков ЛТАК отмечена пролиферация лимфобластных клеток; 4) клеточный состав лимфоидных узелков представлен В-лимфоцитами. Большинство Т-лимфоцитов расположены вокруг лимфоидных узелков или в межузелковых зонах ЛТАК; 5) ЛТАК у свиней является местной иммунной системой, кото-

рая содержит все структуры и клетки, необходимые для формирования иммунной реакции и защиты пароккулярных тканей.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: З.К.К., К.С.А.

Сбор и обработка материала: З.К.К., А.Ш.И., М.Р.

Статистическая обработка данных:

Анализ и интерпретация данных: З.К.К., К.С.А., А.Ш.И.

Написание текста: З.К.К., К.С.А., А.Ш.И., М.Р.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Astley R.A., Chodosh J., Caire W., Wilson G.M. Conjunctival lymphoid follicles in New World rodents // *Anat. Rec.* 2007. Vol. 290. P. 1190–1194.
2. Astley R.A., Kennedy R.C., Chodosh J. Structural and cellular architecture of conjunctival lymphoid follicles in the baboon (*Papio anubis*) // *Exp. Eye Res.* 2003. Vol. 76. P. 685–694.
3. Chodosh J., Nordquist R.E., Kennedy R.C. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site // *Dev. Comp. Immunol.* 1998. Vol. 22. P. 621–630.
4. Fix A.S., Arp L.H. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in normal and *Bordetella avium*-infected turkeys // *Vet. Pathol.* 1989. Vol. 26. P. 222–230.
5. Giuliano E.A., Finn K. Characterization of membranous (M) cells in normal feline conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) // *Vet. Ophthalmol.* 2011. Vol. 14. P. 60–66.
6. Knop E., Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection // *J. Anat.* 2005. Vol. 206. P. 271–285.
7. Knop N., Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. Vol. 41. P. 1270–1279.
8. Knop N., Knop E. Ultrastructural anatomy of CALT follicles in the rabbit reveals characteristics of M-cells, germinal centres and high endothelial venules // *J. Anat.* 2005. Vol. 207. P. 409–426.
9. Liebler-Tenorio E., Pabst R. MALT structure and function in farm animals // *Vet. Res.* 2006. Vol. 37. P. 257–280.
10. Sakimoto T., Shoji J., Inada N. et al. Histological study of conjunctiva-associated lymphoid tissue in mouse // *Jap. J. Ophthalmol.* 2002. Vol. 46. P. 364–369.

Поступила в редакцию 10.03.2017
Получена после доработки 25.06.2017

AGE-RELATED PECULIARITIES OF HISTOLOGICAL STRUCTURE AND CELLULAR COMPOSITION OF CONJUNCTIVA-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE IN PIGS

Irgashev A.Sh.¹, Kalandarova Z.K.¹, Arbayev K.S.¹, Reinacher M.²

Objective — to study of the structure and cellular composition of conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in pigs in the age aspect.

Materials and methods. The conjunctiva of the lower and upper eyelids was studied in 18 piglets and pigs of both sexes aged 5 to 7 days, 2, 6 and 12 months. Histological, histochemical and immunohistochemical methods were used to detect structural changes and to demonstrate T lymphocyte marker (CD3), B-lymphocyte marker (CD79a) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Results. In 5–7-day-old piglets goblet cells were poorly developed in the conjunctiva, and CALT was represented by single lymphocytes, while lymphoid nodules were absent. In 2 month-old piglets the conjunctival goblet cells were well developed, and CALT contained diffuse accumulations of lymphocytes and plasma cells. In 6- and 12-month-old pigs CALT contained lymphocytes, plasma cells and lymphoid nodules. In thinned areas of the conjunctiva covering the lymphoid nodules, goblet cells were single or missing. Immunohistochemical studies showed that CALT in 5–7-day-old piglets contained only T-lymphocytes. In other groups it contained both T- and B-lymphocytes. Lymphoid nodules were represented by B-lymphocytes, while T-lymphocytes were mainly located in CALT internodular zones. In the germinal centers of lymphoid nodules proliferation of lymphoblasts was demonstrated.

Conclusions. The morphological data obtained indicate the presence in the pig parocular tissue of an immune system in the form of CALT containing lymphoid cells and structures necessary for the induction of the immune response both on the ocular surface and in parocular tissues.

Key words: conjunctiva-associated lymphoid tissue, histological structure, immunohistochemistry, pigs

¹ Department of Veterinary Sanitary Expertise, Histology and Pathology, Kyrgyz K.I. Skryabyn National Agrarian University, 68 Mederova St, Bishkek 720005, Kyrgyz Republic;

² Department of Veterinary Pathology, Justus-Liebig-University, 96 Frankfurter Str., Giessen 35392, Germany