

© Коллектив авторов, 2013
УДК 612.017:611.41.018

*В. Б. Зайцев, Н. С. Федоровская, Д. А. Дьяконов, А. М. Федоровский,
Л. В. Дорох, Е. В. Коледаева и И. Н. Гамулинская*

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕЗЕНКИ ЧЕЛОВЕКА (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — д-р биол. наук О. Б. Жданова), Кировская государственная медицинская академия; лаборатория патоморфологии крови (зав. — канд. мед. наук Н. С. Федоровская), Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России

С использованием иммуногистохимических и морфометрических методов изучены количественный состав и структурная локализация иммунокомпетентных клеток селезенки человека ($n=20$, секционный материал). Представлены подробные морфофункциональные характеристики белой и красной пульпы органа. Изучены клеточные субпопуляции Т- ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) и В-лимфоцитов ($CD20^+$), натуральных киллеров ($CD57^+$), тканевых макрофагов ($CD68^+$), дендритных клеток ($CD35^+$, $S100^+$). Анализ соотношений иммунокомпетентных клеток в различных компартментах белой и красной пульпы может стать основой для оптимизации постановки гистопатологического диагноза в клинической практике.

Ключевые слова: селезенка, белая и красная пульпа, иммуногистохимия, морфометрия, человек

Селезенка — самый крупный периферический орган иммунной системы, однако до настоящего времени недостаточно изучены корреляции развития иммунных и фильтрационных процессов со структурной организацией его белой и красной пульпы, количественные соотношения площадей, занимаемых функционально различными отделами органа, и состав их основных популяций иммунокомпетентных клеток. Последние данные литературы [13] свидетельствуют о том, что ранее полученные результаты исследований гистофизиологии селезенки у различных животных недопустимо экстраполировать на селезенку человека, имеющую свои морфофункциональные особенности [9]. Фрагментарность и противоречивость сведений о строении селезенки человека обусловили необходимость проведения настоящей работы, цель которой — изучить количественный состав, локализацию и функциональные особенности иммунокомпетентных клеток селезенки человека.

Материал и методы. Для анализа взят аутопсийный материал селезенки у 20 человек (12 мужчин, 8 женщин), не имевших признаков спленомегалии и другой патологии этого органа (Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови). Медиана их возраста составила 39 (27–65) лет. Группировка по полу и возрасту

проведена не была в связи с относительной малочисленностью выборки. Исследование проведено в соответствии с современными принципами биомедицинской этики.

Изучение материала проводили на парафиновых гистологических срезах толщиной 3–5 мкм, используя стандартные методы окраски: гематоксилином — эозином и азуром II — эозином. Для иммуногистохимического исследования использовали первичные антитела (Dako, Дания и BioGenex, США) в готовых разведениях, а также систему визуализации EnVision, Peroxidase DAB+ (Dako, Дания), *табл. 1*.

С помощью светового микроскопа (Leica, Германия) со встроенной фотовидеокамерой и программного обеспечения анализа изображений ImageScore Color, версии M (в 20 полях зрения, об. 10, 20, 100, ок. 10) определяли площади, занимаемые различными функциональными зонами, и клеточный состав. Для статистической обработки применяли программу SPSS для Windows Version 17.0 с использованием непараметрических двусторонних критериев Краскела—Уоллеса и Манна—Уитни. Результаты исследований представлены с указанием медианы, а также нижнего (25%) и верхнего (95%) квартиля (в тексте статьи и таблицах последние даны в скобках).

Результаты исследования. Выявлено, что относительная площадь белой пульпы составляет 10,7 (8,4–16,7)%. Клеточный состав белой пульпы структурно специфичен, кроме скоплений Т- и В-лимфоцитов, она содержит плазматические клетки, макрофагальные элементы и дендритные клетки.

Сведения об авторах:

Зайцев Валерий Борисович (e-mail: zaitsev@kirovvgma.ru), *Федоровский Андрей Михайлович* (e-mail: anrizon@rambler.ru), *Дорох Любовь Владимировна*, *Коледаева Елена Владимировна*, *Гамулинская Ирина Николаевна*, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Кировская государственная медицинская академия, 610027, Киров, ул. К. Маркса, 112

Федоровская Надежда Станиславовна (e-mail: fednadst@mail.ru), *Дьяконов Дмитрий Андреевич* (e-mail: DiakonovDA@rambler.ru), лаборатория патоморфологии крови, Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России, 610027, Киров, ул. Красноармейская, 72

Таблица 1

Характеристика использованных первичных антител

Выявляемые антигены	Клон	Фирма и страна-производитель	Маркируемые клетки
CD20	L26	Dako, Дания	В-лимфоциты
CD79 α	JCB117	Dako, Дания	Общая популяция В-клеток
CD3	PS1	Dako, Дания	Общая популяция Т-лимфоцитов
CD8	C8/144B	Dako, Дания	Цитотоксические Т-лимфоциты
CD4	4B12	BioGenex, США	Т-хелперы
CD45	pD7/26 and 2B11	Dako, Дания	Лейкоциты
CD57	NK1	Dako, Дания	Натуральные киллеры
MAC 387	MAC387	Dako, Дания	Нейтрофилы, клетки моноцитарно-гистиоцитарного ряда
CD68	PG-M1	Dako, Дания	Тканевые макрофаги
CD35	RLB25	BioGenex, США	Дендритные клетки
S-100		Dako, Дания	Интердигитирующие дендритные клетки
Factor VIII	Polyclonal	Dako, Дания	Эндотелиоциты, мегакариоциты

Примечание. Все антитела были готовы к использованию.

Площади, занимаемые отделами, на которые подразделяется белая пульпа (рисунк, а–в): маргинальная зона (МЗ), периартериолярные лимфоидные муфты (ПАЛМ) и лимфоидные узелки (ЛУ), представлены в табл. 2.

Относительная площадь красной пульпы составляет 85,4 (81,5–89,1)%. Она включает 3 вида сосудистых структур: артериальные капилляры, синусоиды и пульпарные вены. Все эти сосуды поддерживаются ретикулярной тканью, которая образует пульпарные тяжи (тяжи Бильбота). Количество макрофагов в этой области может быстро увеличиваться в результате поступления из кровотока моноцитов и их дальнейшей дифференцировки (см. рисунок, г, д). Площадь, занимаемая трабекулами, составляет 3,7 (1,9–4,2)%.

Перифолликулярная зона (ПФЗ) окружает маргинальную на границе с красной пульпой и

представляет собой небольшое пространство, заполненное кровью, без эндотелия (см. рисунок, в, г). Учитывая, что в ПФЗ нет преобладающей популяции лимфоцитов, отвечающих за иммунные процессы, основными функциями ее можно считать депонирующую и фильтрационную, которые более свойственны красной пульпе.

Количественный состав иммунокомпетентных клеток в селезенке был оценен при использовании специфических маркеров (табл. 3). Лимфоциты локализовались преимущественно в белой пульпе, с преобладанием тех или иных субпопуляций в соответствующих зонах. В красной пульпе лимфоидные элементы встречались в небольшом количестве.

В результате иммуногистохимического исследования установлено (табл. 4), что основная часть моноцитов и тканевых макрофагов (CD68⁺) лока-

Таблица 2

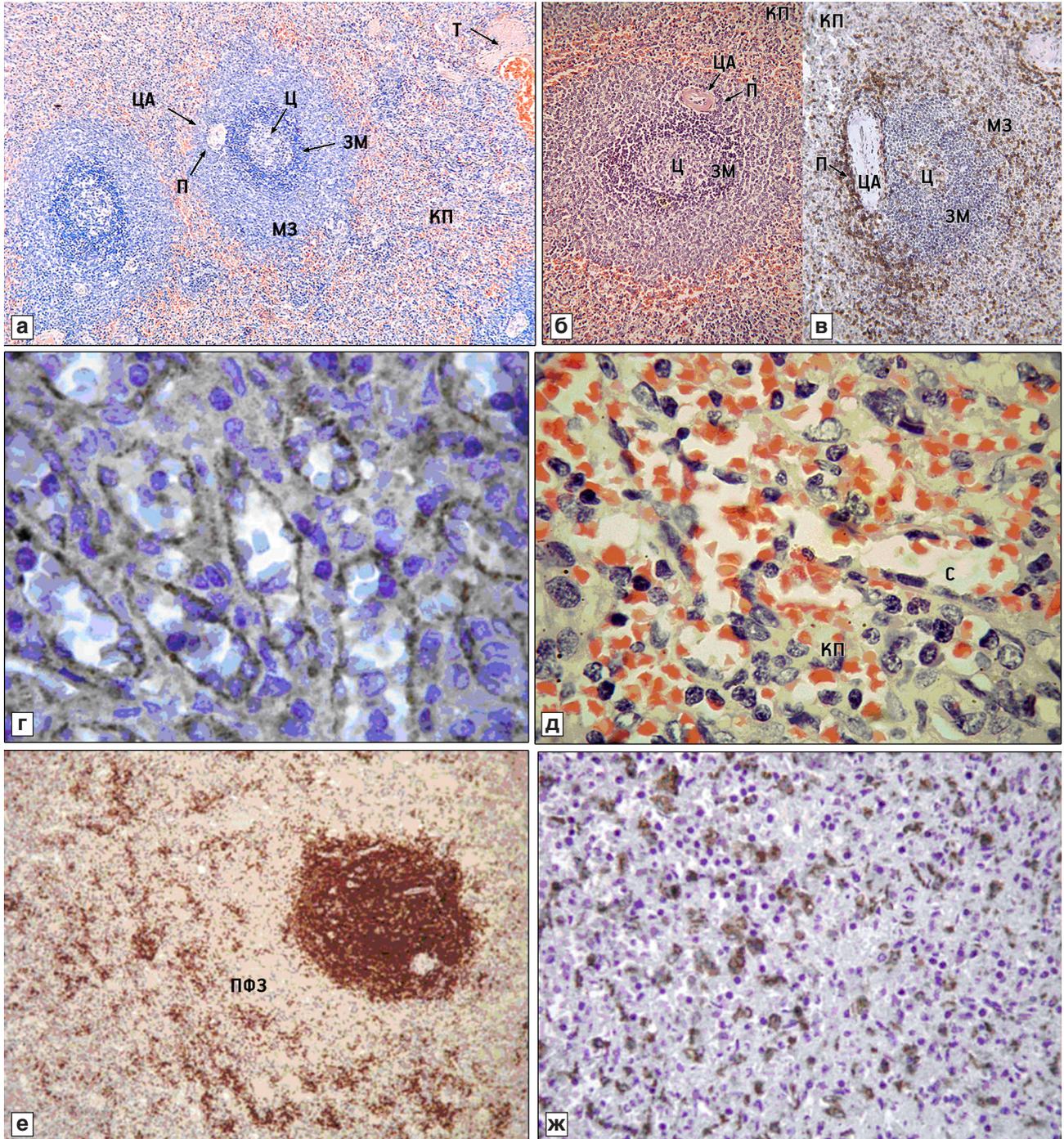
Относительные и абсолютные площади сечения различных функциональных зон белой пульпы селезенки человека

Зоны белой пульпы	Относительная площадь, %	Абсолютная площадь, мкм ²
Маргинальная зона	1,05 (0,6–2,05)	8850 (4425–17475)
Периартериальная лимфоидная муфта	1,7 (1,4–2,2)	17540 (14326–22372)
Лимфоидные узелки (первичные и вторичные):	6,5 (5,4–10,7)	64650 (53550–105525)
герминативные центры (Ц)	0,3 (0,0–1,3)	3000 (375–12225)
зона мантии (ЗМ)	5,9 (5,1–9,6)	58800 (50700–94050)

Таблица 3

Клеточный состав популяции лимфоидных клеток в селезенке человека

Показатели	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD20 ⁺	CD79 α ⁺	CD57 ⁺
Доля клеток, %	10,2 (8,6–12,3)	7,1 (5,1–8,0)	0,3 (0,2–0,5)	8,7 (6,5–14,8)	14,1 (10,2–18,3)	3,6 (2,5–5,3)



Селезенка человека 55 (а–в) и 48 лет (г–ж).

П — периартериальное лимфоидное влагалище; ЦА — центральная артерия; Ц — герминативный центр; МЗ — маргинальная зона; КП — красная пульпа; Т — трабекула; ЗМ — зона мантии; ПФЗ — перифолликулярная зона; С — синусоиды. а — окраска азуром II — эозином; б, д — окраска гематоксилином — эозином; в — иммуногистохимическая реакция на антиген CD3 (Т-лимфоциты); г — Factor VIII (клетки эндотелия и тромбоциты); е — иммуногистохимическая реакция на антиген CD45 (общий лейкоцитарный антиген); ж — иммуногистохимическая реакция на антиген CD68 (макрофаги). а — об. 10, ок. 10; б, в — об. 20, ок. 10; г, д — об. 100, ок. 10; ж — об. 40, ок. 10

лизована в красной пульпе органа, вдоль синусоидов и в МЗ (см. рисунок, ж). Популяция гранулоцитов, моноцитов-гистиоцитов, экспрессирующих MAC387, преобладала в МЗ, месте начального поступления антигенов, также в небольшом количестве эти клетки присутствовали в красной пульпе. Оценку содержания дендритных клеток

в селезенке осуществляли при помощи CD35⁺ и S-100⁺. CD-позитивные клетки определялись преимущественно в МЗ, в небольшом количестве они были рассеяны в красной пульпе. Клетки, дающие положительную реакцию на S-100, выявлялись в зонах герминативных центров ЛУ и красной пульпе.

Таблица 4

Содержание популяций гранулоцитов, моноцитов и дендритных клеток в селезенке

Показатели	MAC387 ⁺	CD68 ⁺	CD35 ⁺	S-100 ⁺
Доля клеток, %	18,0 (13,7–21,9)	7,4 (6,4–10,5)	1,0 (0,7–1,3)	0,7 (0,4–0,8)

Обсуждение полученных данных. Селезенка является сложным полифункциональным органом иммунной системы. Все структурные элементы органа выполняют свои специализированные функции, которые направлены на улавливание патологических субстратов, их распознавание, уничтожение с помощью фагоцитоза и формирования иммунного ответа [1–4]. Большинство Т- и В-лимфоидных элементов белой пульпы селезенки являются частью рециркулирующего пула лимфоцитов, непрерывно мигрирующих по всем лимфоидным органам и другим тканям. Фильтрационные компартменты селезенки, состоящие из стромы — ретикулярной ткани и клеток гемопоэтического происхождения, включая макрофаги, интердигитирующие дендритные клетки (ИДК) и фолликулярные дендритные клетки (ФДК), позволяют селезенке эффективно распознавать, выбраковывать и удалять из организма дефектные, старые и изношенные клетки. Многочисленные исследования демонстрируют, что вход и задержка Т- и В-лимфоцитов в белой пульпе являются сложным процессом [5, 8]. Это происходит за счет взаимодействия между лимфоцитами, эндотелиальными клетками и адрессином MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1). Селектины и адрессины обеспечивают относительно слабую адгезию клеток, однако, достаточную для селективной остановки клетки в нужном месте. Белки, синтезированные клетками стромы (коллаген III типа, ламинин, фибронектин, витронектин и тенасцин), активно участвуют в миграции лимфоцитов в ходе иммунного ответа [7, 11].

МЗ играет важную роль в поглощении из периферической крови антигенов вследствие гармоничного взаимодействия макрофагов и В-клеток. В МЗ происходят сортировка приходящих из крови лимфоцитов в Т- и В-зоны, задержка и фагоцитоз поврежденных эритроцитов, депонирование тромбоцитов для быстрого их выхода в кровотоки [8, 14, 15]. Форменные элементы крови, поступающие в эту зону, направляются затем выборочно: лимфоциты — к ПАЛМ и первичным (вторичным) ЛУ, а тромбоциты и эритроциты — в красную пульпу. Кроме рециркулирующих клеток, проходящих через МЗ, этот отдел содержит некоторое количество резидентных В-клеток — памяти и клеток, которые могут вовлекаться в быстрый первичный иммунный ответ [13, 15].

Наши данные о количественном составе иммунокомпетентных клеток в селезенке человека коррелируют с результатами исследования селезенки у больных с посттравматической спленэктомией [10].

Замедление скорости кровотока в МЗ способствует эффективному распознаванию антигенов макрофагами, которые обладают чрезвычайно мощной фагоцитирующей функцией, даже в отсутствие предварительной опсонизации [13]. Антигены в МЗ могут напрямую связываться с В-клетками памяти и находиться там длительный период времени в тесном контакте с макрофагами МЗ. Затем клетки памяти мигрируют в ПАЛМ и также представляют антигены Т-клеткам [5, 8, 12].

Антигены могут поступать в селезенку с ИДК, которые их представляют Т-клеткам в ПАЛМ. ИДК имеют длинные разветвленные отростки и строго позитивны по молекулам главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex) МНС — II класса. Они являются потенциальными клетками в обработке и представлении антигенов для активации наивных Т-лимфоцитов. Вместе с тем, ИДК также секретируют факторы, которые важны для регуляции гомеостаза в ПАЛМ.

Функциональная активность ЛУ определяется тем, на какой стадии развития находятся их герминативные центры: период формирования, появления и нарастания числа делящихся клеток, активного функционирования и обратного развития [13]. Архитектоника ЛУ зависит от взаимодействий между лимфоцитами и ФДК [6]. Фенотип ФДК включает экспрессию молекулы адгезии сосудистых клеток (VCAM-1). Появление VCAM-1 и MAdCAM-1 требует антигенного стимула, совпадает с образованием герминативных центров и может служить индикатором активации ФДК. При встрече циркулирующих В-лимфоцитов со специфическим антигеном, представленным в виде иммунного комплекса на поверхности ФДК, они задерживаются внутри ЛУ. Специфические В-клетки начинают пролиферировать и затем их гены на переменных участках Ig подвергаются соматической гипермутации, а далее происходит их дифференцировка и селекция [6, 12, 13]. Субпопуляция антиген-неиндуцированных зрелых наивных В-клеток оттесняется к периферии первичного узелка, образуя зону мантии, которая

окружает герминативный центр и состоит, главным образом, из плотно расположенных малых В-лимфоцитов.

Хорошо сформированная сетчатая система из ретикулярных волокон красной пульпы, открытая для тока крови, выполняет фильтрационную роль. Клетки крови постоянно мигрируют из пульпарных тяжей в просвет синусоидов. Старые, патологически измененные или поврежденные форменные элементы крови (в первую очередь эритроциты), неспособные к миграции в синусоид, целиком фагоцитируются и перевариваются макрофагами. Фильтрационная функция селезенки значительно повышается под действием продуктов специфического иммунного ответа — как цитокинов, так и иммуноглобулинов. В то же время, распознавание, транспорт и обработка антигенов фагоцитами и другими стромальными клетками очень важны для индукции Т- и В-клеточного иммунного ответа, а также секреции специфических иммуноглобулинов.

ПФЗ, присущая исключительно селезенке человека, описана в единичных работах [11, 13, 14]. Кроме скоплений гранулоцитов и моноцитов, в ней имеются эллипсоиды или периартериальные макрофагальные влагища, состоящие из макрофагов, экспрессирующих сиалоадгезин и CD68⁺. В красной пульпе макрофаги, входящие в эллипсоиды, сиалоадгезин-негативны. В этой области может также обнаруживаться большое количество В-клеток памяти (IgD^{+/−}, IgM⁺, CD27^{+/−}).

Таким образом, проведенное иммуногистохимическое исследование позволило локализовать, дифференцировать и установить количественные характеристики различных функциональных отделов селезенки человека, что может быть использовано в клинической практике при диагностике патологических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

- Жарикова Н. А. Периферические органы системы иммунитета (развитие, строение, функция). Минск, Беларусь, 1979.
- Молдавская А. А. и Долин А. В. Сравнительная характеристика изменений дефинитивной структуры селезенки на фоне хронической алкогольной интоксикации в эксперименте и у человека. Успехи соврем. естествозн., 2009, № 2, с. 11–14.
- Смирнова Т. С. и Ягмуров О. Д. Строение и функции селезенки. Морфология, 1993, т. 104, вып. 5–6, с. 142–156.
- Шевцов А. Р., Головнев В. А. и Голубева И. А. Морфология селезенки в норме, при моделировании синдрома длительного сдавления и в условиях применения полифенолов манжетки обыкновенной. Вестн. НГУ. Сер. биол., клин. мед., 2006, т. 4, № 3, с. 62–65.
- Attanavanich K. and Kearney J. F. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. J. Immunol., 2004, v. 172, № 2, p. 803–811.
- Aydar Y., Balogh P., Tew J. G. and Szakal A. K. Follicular dendritic cells in aging, a «bottle-neck» in the humoral immune response. Ageing Res. Rev., 2004, № 3, № 1, p. 15–29.
- Kraal G. and Mebius R. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. Int. Rev. Cytol., 2006, v. 250, p. 175–215.
- Lopes-Carvalho T., Foote J. and Kearney J. F. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. Curr. Opin. Immunol., 2005, № 17, № 3, p. 244–50.
- Mebius R. E. and Kraal G. Structure and function of the spleen. Nature Rev. Immunol., 2005, v. 5, p. 606–616.
- Olsson B., Ridell B., Jernas M. and Wadenvik H. Increased number of B-cells in the red pulp of the spleen in ITP. Ann. Hematol., 2012, v. 91, p. 271–277.
- Steiniger B., Barth P., Herbst B. et al. The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perfollicular zone, but not in the marginal zone. Immunology, 1997, v. 92, p. 307–316.
- Steiniger B., Trabandt M. and Barth P. J. The follicular dendritic cell network in secondary follicles of human palatine tonsils and spleens. Histochem. Cell Biol., 2011, v. 135, p. 327–336.
- Vasco P. G., Villar J. L., Rodríguez G. F. and Martínez J. I. Immunohistochemical organization patterns of the follicular dendritic cells, myofibroblasts and macrophages in the human spleen — new considerations on the pathological diagnosis of splenectomy pieces. Int. J. Clin. Exp. Pathol., 2010, v. 3, № 2, p. 189–202.
- Weill J.-C., Weller, S. and Reynaud C. A. Human marginal zone b cells. Ann. Rev. Immunol., 2009, v. 27, p. 267–285.
- Wen L., Brill-Dashoff J., Shinton S. A. et al. Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen. Immunity, 2005, v. 23, № 3, p. 297–308.

Поступила в редакцию 25.08.2012
Получена после доработки 15.11.2012

MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF HUMAN SPLEEN (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

V. B. Zaitsev, N. S. Fedorovskaya, D. A. Diakonov, A. M. Fedorovskiy, L. B. Dorokh, Ye. V. Koledayeva and I. N. Gamulinskaya

Using immunohistochemical and morphometric methods, the quantitative composition and structural localization of immunocompetent cells were studied in human spleen (n=20, autopsy material). The detailed morpho-functional characteristics of splenic white and red pulp are presented. Cell subpopulations of T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) and B lymphocytes (CD20⁺), natural killer cells (CD57⁺), tissue macrophages (CD68⁺) and dendritic cells (CD35⁺, S100⁺) were studied. An analysis of the correlations of immunocompetent cells in different regions of white and red pulp may become the basis for optimization of histopathological diagnosis definition in clinical practice

Key words: spleen, white and red pulp, immunohistochemistry, morphometry, man

Department of Histology, Embryology and Cytology, Kirov State Medical Academy; Laboratory of Blood Pathomorphology, Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion