

# MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF INTERRELATIONS OF LYMPHOID NODULES, LYMPHATIC CAPILLARIES AND LYMPHOCYTE MIGRATION IN THE WALL OF INTESTINE AND TRACHEA

G. G. Aminova, D. Ye. Grigorenko and M. R. Sapin

The objective of this study was to identify the peculiarities of lymphocyte migration in lymphoid nodules of the mucous membrane of the caecum and the trachea in autopsy material, obtained from 25 healthy individuals of various ages (from the newborns to the persons of 1<sup>st</sup> mature age). Also, the tendinous center of diaphragm was studied in 10 healthy rabbits. Using histological methods, the presence of two functionally different types of lymphatic capillaries in the wall of the caecum was demonstrated. The first group includes numerous

lymphatic capillaries located around the base of the lymphoid nodules. A large number of lymphocytes in portions enter the lumen of the capillaries, in accordance with the intestinal wall contractions. The second group includes the rest of the lymphatic capillaries, draining the intestinal wall and the capillaries of the trachea, resorbing mainly the interstitial fluid. The migration of lymphocytes from the lymphoid nodules of the trachea was directed, mainly, towards the surrounding tissues. Using the lymphatic capillaries of the diaphragm as a model, it was demonstrated that during the migration of the cells through the endothelium, argyrophilic structures — the stigmata, were formed which disappeared after the passage of the cells.

**Key words:** lymphocyte, migration, lymphatic capillary, lymphoid nodule

Laboratory of Functional Anatomy, RAMS Institute of Morphology, Moscow

© М. С. Виноградова, А. Р. Боярская, Е. А. Прокопьева, 2013  
УДК 612.64:612.46:599.323.4

М. С. Виноградова, А. Р. Боярская и Е. А. Прокопьева

# ОСОБЕННОСТИ ПРЕ- И ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПОЧЕК У ВАЗОПРЕССИН-ДЕФИЦИТНЫХ КРЫС ЛИНИИ БРАТТЛБОРО

Кафедра физиологии (зав. — д-р мед. наук академик РАН Л. Н. Иванова), Новосибирский государственный университет

Цель работы — изучение пре- и постнатального развития почек у потомства вазопрессин-дефицитных крыс линии Браттлборо в сравнении с нормальными крысами линии Вистар. Исследование проведено на светооптическом уровне с использованием гистологических, гистохимических и морфометрических методов. Исследованы 50 16- и 18-суточных плодов и 46 крысят в возрасте 1, 5, 10, 20, и 30 сут постнатального развития. Показано, что последовательность нефрогенеза у крыс обеих линий одинакова, однако для плодов и крысят линии Браттлборо характерно ускоренное развитие почечных телец и канальцев. Результаты позволяют заключить, что прямое влияние вазопрессина на формирование структурных элементов нефрона отсутствует, но предполагается, что он принимает участие в регуляции биосинтеза гиалуронана интерстициальной соединительной ткани мозгового вещества почки, вовлекаемого в механизм осмотического концентрирования мочи.

**Ключевые слова:** почка, почечное тельце, крысы линии Браттлборо, пренатальный онтогенез, постнатальный онтогенез

Поддержание водно-солевого баланса и постоянства внутренней среды организма — одна из основных функций вазопрессина (антидиуретического гормона, АДГ). Кроме того, вазопрессин регулирует пролиферацию фибробластов в сердце и глиальных клеток ЦНС, влияет на дифференцировку нейронов, формирование условных рефлексов, на синтетическую активность мезангиальных клеток [3, 4, 9]. Однако до сих пор остается неясным, влияет ли вазопрессин на развитие почек в пре- и постнатальном периодах при отсутствии вазопрессина у матери. Удобной моделью для решения

этого вопроса являются крысы линии Браттлборо с генетическим дефектом биосинтеза вазопрессина [13]. Цель настоящей работы — изучение развития почек у потомства вазопрессин-дефицитных крыс линии Браттлборо в сравнении с нормальными крысами линии Вистар.

Материал и методы. Работа выполнена на лабораторных крысах линии Вистар и гомозиготных крысах Браттлборо, лишенных эндогенного вазопрессина вследствие делеции в кодирующей части гена и характеризующихся гипоталамическим несахарным диабетом [13]. Крыс содержали в стандартных условиях вивария при естественном

## Сведения об авторах:

Виноградова Мария Сергеевна (e-mail: marsvin2000@mail.ru), Боярская Анна Романовна (e-mail: boyarskaya.a.r@mail.ru), Прокопьева Елена Александровна (e-mail: ellap@live.ru), кафедра физиологии, Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Морфометрические показатели у плодов и крысят линий Вистар и Браттлборо ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )

| Период онтогенеза | Срок развития, сут | Крысы линии |               |                |                           |                                                           |            |
|-------------------|--------------------|-------------|---------------|----------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|------------|
|                   |                    | Вистар      |               |                | Браттлборо                |                                                           |            |
|                   |                    | Количество  | Масса тела, г | Масса почек, г | Осмолярность мочи, моль/л | Плотность расположения почечных телец, штук в поле зрения | Количество |
| Пренатальный      | 16-е               | 19          | 0,59±0,10     | —              | —                         | —                                                         | —          |
|                   | 18-е               | 14          | 1,51±0,10     | 0,02±0,03      | —                         | —                                                         | —          |
| Постнатальный     | 1-е                | 15          | 5,7±0,5       | 0,05±0,08      | —                         | —                                                         | 12±3       |
|                   | 5-е                | 3           | 12,7±0,6      | 0,08±0,02      | 348±22                    | 17±5                                                      | 16±3       |
|                   | 10-е               | 3           | 24±0,5        | 0,2±0,02       | 530±30                    | 26±4                                                      | 12±3       |
|                   | 20-е               | 3           | 44±3          | 0,30±0,01      | 1158±45                   | 13±5                                                      | 12±3       |
|                   | 30-е               | 3           | 177,1±2,0     | 0,90±0,20      | 1494±257                  | 8±2                                                       | 6±2        |
|                   |                    |             |               |                |                           | 7±2                                                       |            |

\* P&lt;0,05, \*\* P&lt;0,01 по сравнению с крысками линии Вистар.

освещении и свободном доступе к воде и корму. Животных декапитировали согласно общепринятым нормам биоэтики и в соответствии со статьей 11 Хельсинской декларации второй Медицинской Ассоциации (1964 г.), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). Материал взят у 50 16- и 18-суточных плодов и у 46 новорожденных, 5-, 10-, 20- и 30-суточных крысят линий Браттлборо и Вистар (таблица).

Начиная с 5-суточного возраста, у крысят измеряли осмолярность мочи криоскопическим методом с помощью миллиосмометра МТ-2. После извлечения почки взвешивали, фиксировали в формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы окрашивали гематоксилином — эозином, по Ван Гизону, альциановым синим, проводили реакции Хэйла и ШИК, использовали контроль с тестикулярной гиалуронидазой. Измеряли величину почечных телец и оценивали плотность расположения путем подсчета их количества в поле зрения микроскопа AxioStar 40 (Carl Zeiss, Германия) при об. 20, ок. 16 в трех полях зрения в почках каждого животного. Значимость различий сравниваемых величин оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты исследования.** На уровне световой микроскопии выделены следующие стадии развития почечных телец: I — клеточные уплотнения и пузырьки, II — S-образные тельца, III — зачатки почечных телец, IV — молодые почечные тельца, V — «зрелые» почечные тельца, по строению близкие к наблюдаемым у взрослых особей. Выявлена одинаковая последовательность формирования почечных телец у крыс линии Вистар и крыс Браттлборо, но по другим параметрам обнаружены различия.

В почках у плодов крыс на 16-е сутки развития плотный метанефрогенный зачаток с формирующимися в нем элементами нефронов узкой полосой расположен непосредственно под капсулой, тогда как вся центральная часть органа занята мезенхимой, которая пронизана собирательными протоками, направленными в сторону капсулы, и редкими кровеносными сосудами. Канальцы нефронов отсутствуют. У плодов крыс линии Вистар (рис. 1, а) почки имеют хорошо выраженную капсулу. Закладки почечных телец плотно прилегают друг к другу, находятся на I и II стадиях развития и редко встречаются на III стадии. Почки плодов крыс линии Браттлборо (см. рис. 1, б) отличаются неполной изолированностью от окружающих тканей; под капсулой рыхло расположены клеточные уплотнения и пузырьковидные структуры (I стадия).

В почках плодов обеих линий на 18-е сутки расширена зона будущей коры почки. Выявляются извитые проксимальные канальцы. У плодов крыс линии Браттлборо почечные тельца расположены реже, но более развиты, чем у плодов крыс линии Вистар, в их корковом веществе преобладают тельца IV стадии; в юкстамедуллярной зоне коркового вещества — тельца V стадии.

В корковом веществе почек новорожденных крысят сохраняются различия в плотности расположения телец (выше у крыс линии Вистар) (см. таблицу) и степени их развитости. Проксимальные канальцы занимают всю

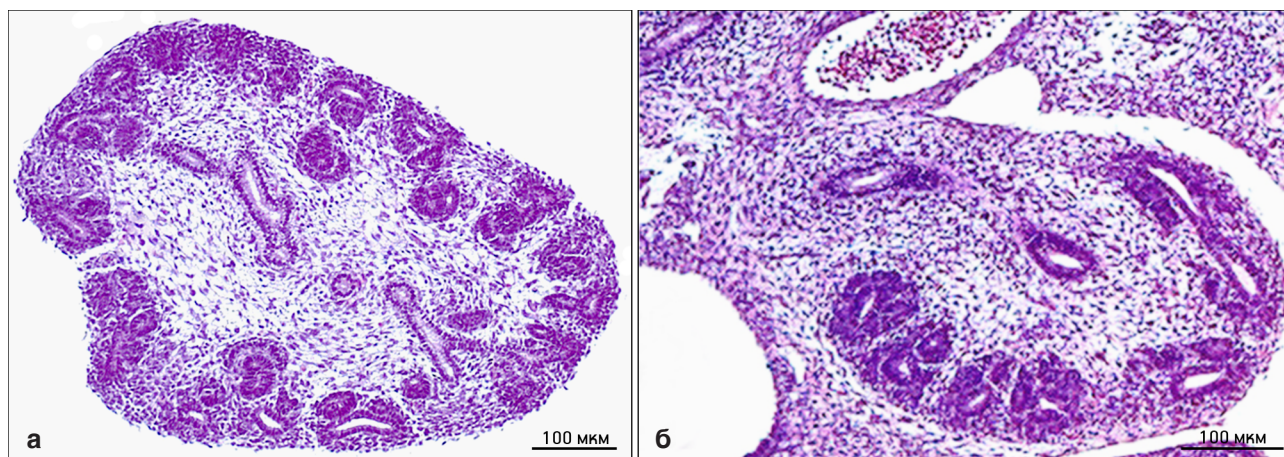


Рис. 1. Почки 16-суточных плодов крыс линий Вистар (а) и Браттлборо (б).

Видна разница степени изолированности формирующихся почек от окружающих тканей и плотности расположения закладок почечных телец. Окраска гематоксилином

площадь среза между почечными тельцами, встречаются дистальные канальцы; петли нефронов еще не развиты. Собирающие протоки образуют плотные скопления у основания сосочков. Широко представлена рыхлая соединительная ткань. В почках новорожденных крысят линии Браттлборо отсутствуют ранние стадии развития почечных телец, следовательно, наступает фаза роста и созревания нефронов. У крысят линии Вистар под капсулой почки имеются все ранние стадии развития почечных телец, что указывает на продолжение процесса активного новообразования нефронов.

На 5-е сутки жизни у крысят линии Браттлборо отсутствуют ранние стадии развития почечных телец (рис. 2, а, б), они отеснены от капсулы проксимальными канальцами и начальными отделами собирающих протоков. Размеры почечных телец крупные, особенно в юкстамедуллярной зоне.

Многочисленные срезы проксимальных канальцев имеют широкие просветы, дистальные канальцы хорошо видны. Тонкие отделы петель встречаются очень редко. Для почек крысят линии Вистар по-прежнему характерно компактное расположение почечных телец, их плотное прилегание к капсуле и разнообразие по степени зрелости, начиная от II стадии. У 10-суточных крысят линии Браттлборо корковое вещество толстое, все почечные тельца находятся на V стадии. У крысят линии Вистар поверхностный слой коркового вещества представлен тельцами IV стадии с умеренной плотностью расположения. В возрасте 20 сут у крысят линии Браттлборо и Вистар в почках имеются только «зрелые» тельца, увеличившиеся в размерах, между ними — канальцы нефронов. К 30-суточному возрасту

почки у крыс обеих линий выглядят окончательно сформированными — с толстым корковым и хорошо выраженным мозговым веществом, удлинившимися сосочками. По сравнению с предыдущими сроками изменились количественные показатели, соответствующие росту животных: массы тела и почек у крыс обеих линий в течение 1-го месяца жизни повышались равномерно, а после 20-х суток произошел резкий подъем обоих показателей (см. таблицу). Возрос диаметр почечных телец у крысят обеих линий: от  $32 \pm 3$  мкм в 5-суточном возрасте до  $83 \pm 13$  мкм у 30-суточных крыс линии Вистар; от  $49 \pm 4$  до  $92 \pm 13$  мкм у крыс линии Браттлборо. Во всех почечных тельцах отчетливо видна полость капсулы клубочка, что свидетельствует о фильтрационной активности органа. Диаметр проксимальных и дистальных канальцев также стал больше. Лучше идентифицируются элементы юкстагломерулярного аппарата.

При исследовании интерстициальной соединительной ткани было обнаружено, что содержание гистохимически выявляемых углеводных соединений у плодов линии Браттлборо существенно ниже, чем у крыс линии Вистар, и это прослеживалось на всем протяжении наблюдения. У новорожденных крыс вазопрессин-дефицитной линии окраска гиалуронана (основного составляющего гликозаминогликанов — ГАГ) в интерстициальной соединительной ткани была близка к фоновой. На 5-е сутки ГАГ у крысят линии Браттлборо выявлялись только в области вершины (гребня) сосочков, то же наблюдалось на 10-е сутки, тогда как у крысят линии Вистар гиалуронан был обнаружен всюду в интерстициальной ткани, хорошо окрашенный альциановым синим и после реакции Хейла. У 20- и 30-суточных крысят линии Вистар



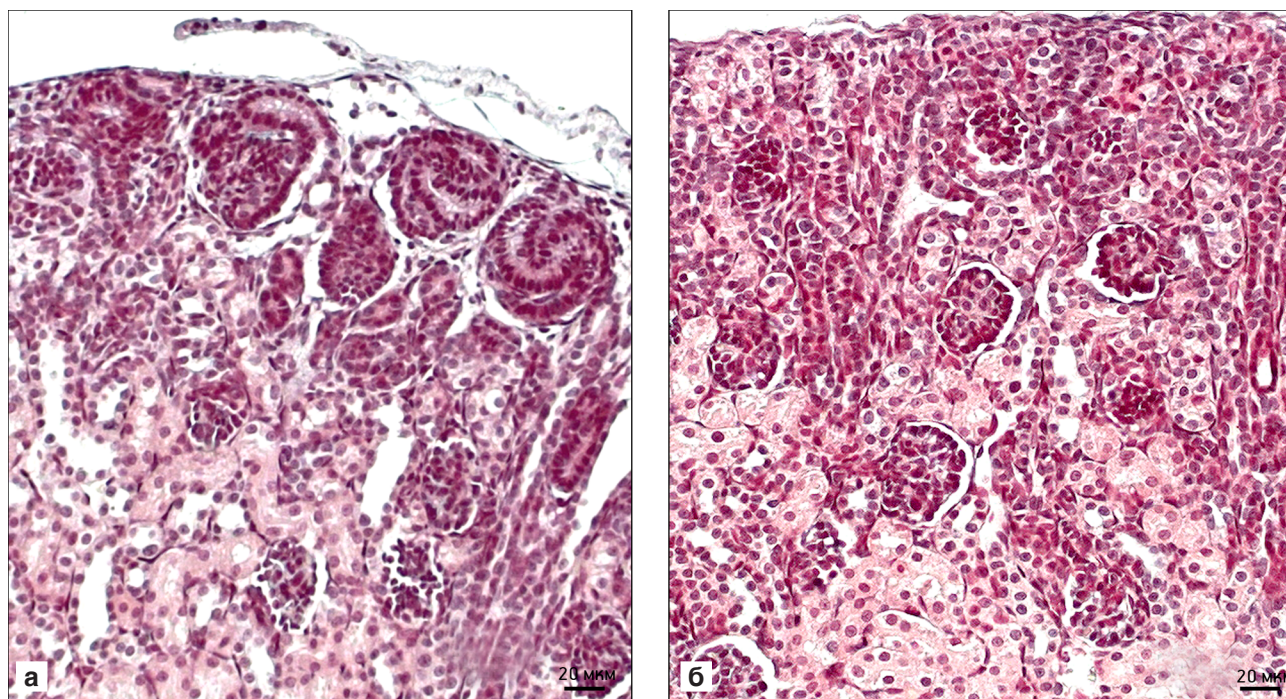


Рис. 2. Субкапсулярная зона коркового вещества почек 5-суточных крысят линий Вистар (а) и Браттлборо (б).

а — ранние стадии формирующихся нефронов у самой капсулы почки; б — почечные тельца более зрелых нефронов расположены рыхло и смещены в толщу коркового вещества. Окраска гематоксилином — эозином

концентрация гиалуронана в интерстициальной соединительной ткани стала выше, особенно в сосочке, где его окраска была наиболее отчетливо выражена (рис. 3, а). У крысят линии Браттлборо интерстициальная соединительная ткань мозгового вещества практически не содержала ГАГ (см. рис. 3, б), исключение составила только самая вершина сосочка, где было выявлено слабое окрашивание. Параллельно с повышением интенсивности окрашивания гиалуронана, с возрастом у крысят линии Вистар возрастают показатели осмолярности мочи, которые к концу 1-го месяца жизни достигают уровня, характерного для взрослых животных (см. таблицу). Обратная картина наблюдается у плодов крыс линии Браттлборо: в их почках ничтожное содержание гиалуронана обнаруживается в пренатальном и раннем постнатальном периоде развития, но его окраска потом почти полностью исчезает. Осмолярность мочи у крысят линии Браттлборо очень низкая после рождения, остается таковой на протяжении всего исследования (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. Морфологические различия в развитии почек у крыс линий Браттлборо и Вистар отмечены в период внутриутробного развития [1] и в начале постнатальной жизни. У 16-суточных плодов крыс линии Браттлборо формирование почек отстает от такового у плодов линии Вистар

того же возраста. С 18 сут почки у плодов крыс линии Браттлборо развиваются ускоренно. Новообразование их нефронов почти завершается к концу внутриутробного периода, тогда как у крыс линии Вистар появление новых почечных телец наблюдается и после рождения. Ускоренное развитие почек у крыс линии Браттлборо согласуется с ранним открытием глазных щелей, быстрым вскрытием ушных проходов и формированием ушных раковин у гомозигот по сравнению с гетерозиготами [15].

В работе уделялось внимание углеводным веществам ткани почки, поскольку существует мнение о корреляции между формированием системы осмотического концентрирования и реакции почки на вазопрессин, с одной стороны, и состоянием основного межклеточного вещества соединительной ткани — с другой стороны, ГАГ которого в значительной мере определяют его гидрофильность и натрий-связывающую функцию [8, 11].

Окрашивание срезов ализановым синим и по Хейлу выявило отчетливые различия в содержании гиалуронана в интерстициальной соединительной ткани почек у крыс линий Вистар и Браттлборо во все исследованные возрастные периоды. Гиалуронан — отрицательно заряженный линейный ГАГ, обладающий уникальной способностью связывать воду и ионы и создавать сопротивление потоку жидкости. Результаты



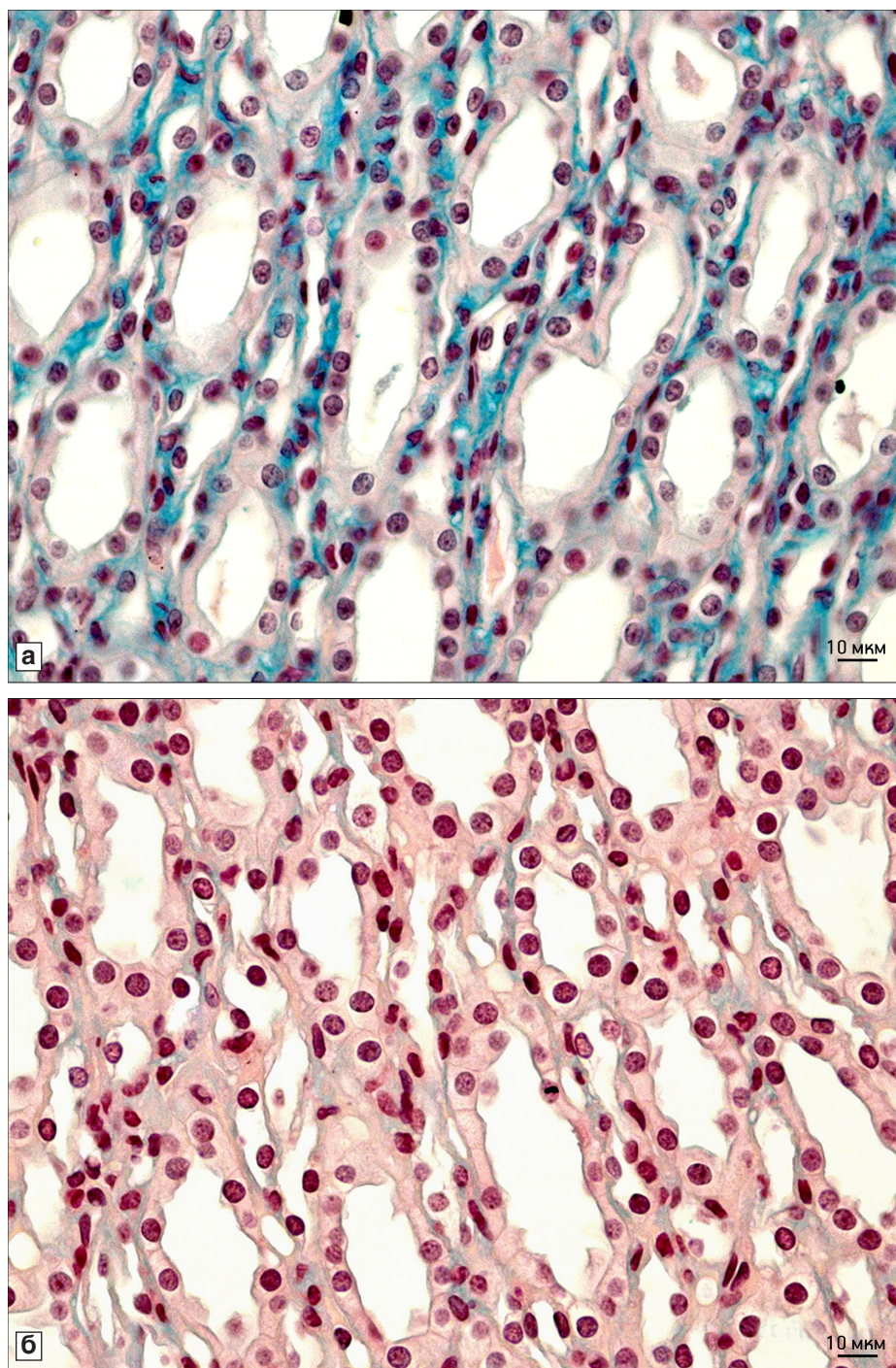


Рис. 3. Средняя треть сосочков почек у 30-суточных крыс линии Вистар (а) и Браттлборо (б).

а — яркая окраска гиалуронана интерстиция; б — гиалуронан не выявляется. Окраска альциановым синим

настоящей работы подтверждают точку зрения о тесной связи функционирования почки с состоянием ее интерстициальной ткани.

На основании данных проведенного исследования, можно предположить, что вазопрессин не оказывает заметного влияния на развитие структур почки, так как у крыс линии Браттлборо ускорена интенсивность развития нефронов при полном отсутствии гормона и у матерей, и у пло-

дов. Кроме того, следует отметить, что у крыс линии Вистар нефрогенез протекает нормально [7], несмотря на то, что секреция эндогенного вазопрессина у плода крайне низка, а гормон матери не проникает через плацентарный барьер [5].

Таким образом, особенности формирования почек у плодов и крысят линии Браттлборо после рождения не могут быть объяснены только генетически обусловленным отсутствием вазопресси-

на в организме матери и потомка. Вероятно, играет определенную роль существенный дисбаланс многих гормонов, оказывающих морфогенетическое действие при отсутствии эндогенного вазопрессина. Так, известно, что у вазопрессин-дефицитных гомозиготных крыс линии Браттлборо снижена концентрация соматотропного и адренокортикотропного гормонов аденогипофиза и окситоцина нейрогипофиза [6, 10, 12, 15], предполагается дисбаланс тиреотропного и тиреоидного гормонов, инсулиноподобных факторов и гормонов плаценты, имеющих ведущее значение в онтогенезе [2, 4, 7, 14]. Для решения вопроса о ведущих факторах, определяющих развитие почки в онтогенезе у крыс линии Браттлборо, очевидно, требуются дополнительные исследования.

*Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-0999.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова М. С., Боярская А. Р. и Иванова Л. Н. Особенности пренатального онтогенеза почек крыс Вистар и вазопрессин-дефицитных крыс Браттлборо. Вестн. НГУ. Серия: биология, клиническая медицина, 2010, т. 8, № 1, с. 45–50.
2. Alsat E., Guibourdenche J., Couturier A. and Evain-Brion D. Physiological role of human placental growth hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1998, v. 140, № 1–2, p. 121–127.
3. Rroiset G., Nijssen M. J. and Kamphuis P. J. Role of corticotropin releasing factor, vasopressin and autonomic nervous system in learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, v. 405, p. 225–234.
4. Incerpi S., Scapin S., D'Arezzo S. et al. Short-term effects of thyroid hormone in prenatal development and cell differentiation. *Steroids*, 2005, v. 70, № 5–7, p. 434–443.
5. Landon M. J., Copas D. K., Shiells E. A. and Davison J. M. Degradation of radiolabelled arginine vasopressin (125I-AVP) by the human placenta perfused in vitro. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1988, v. 95, № 5, p. 488–492.
6. Makara G., Domokos A., Mergl Z. et al. Gender-specific regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the role of vasopressin during the neonatal period. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2008, v. 1148, p. 439–445.
7. Qiu Q., Jiang J., Bell M. and Gruslin A. Activation of endoproteolytic processing of insulin-like growth factor-ii in fetal, early postnatal, and pregnant rats and persistence of circulating levels in postnatal life. *Endocrinology*, 2007, v. 148, № 10, p. 4803–4811.
8. Rugheimer L., Johansson C., Maric C. and Hansell P. Hormonal regulation of renomedullary hyaluronan. *Acta Physiol.*, 2008, v. 195, p. 191–198.
9. Shore L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol. Rev.*, 1988, v. 68, p. 1248–1284.
10. Sokol H. W. and Zimmerman E. A. The hormonal status of the Brattleboro rat. *The Brattleboro rat. Ann. N Y Acad. Sci.*, 1982, v. 394, p. 535–548.
11. Sulyok E. and Nyul Z. Hyaluronan-related limited concentration by the immature kidney. *Med. Hypotheses.*, 2005, v. 65, № 6, p. 1058–1061.
12. Tankosic P., Chateau M. and Burlet A. Postnatal changes in the content of neurohypophyseal enzymes in the Brattleboro rat. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 1980, v. 174, № 1, p. 21–27.
13. Valtin H. The discovery of the Brattleboro rat, recommended nomenclature, and the question of proper controls, in «The Brattleboro rat». *Ann. NY Acad. Sci.*, 1982, v. 394, p. 1–9.
14. Waters M. J. and Kaye P. L. The role of growth hormone in fetal development. *Growth Horm. IGF Res.*, 2002, v. 12, № 3, p. 137–146.
15. Zelena D., Mergl Z. and Makara G. B. Postnatal development in vasopressin deficient Brattleboro rats with special attention to the hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: the role of maternal genotype. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2009, v. 27, № 2, p. 175–183.

Поступила в редакцию 13.04.2012

Получена после доработки 08.08.2012

#### PECULIARITIES OF PRE- AND POSTNATAL KIDNEY DEVELOPMENT IN VASOPRESSIN-DEFICIENT BRATTLEBORO RATS

*M. S. Vinogradova, A. R. Boyarskaya and Ye. A. Prokopiyeva*

The objective of this study was to examine pre- and postnatal development of the kidney in vasopressin-deficient Brattleboro rats in comparison as compared to that in Wistar rats. Histological, histochemical and morphometric methods at light microscopic level were used. The study included 50 fetuses at gestational days 16 and 18, and 46 rat pups at postnatal days 5, 10, 20, and 30. It was found that nephrogenesis sequence in both rat strains was similar, however, Brattleboro embryos and infant rats were characterized by an accelerated growth of renal corpuscles and renal tubules. The results suggest that vasopressin has no direct effect on the formation of nephron structural elements, however it may participate in the regulation of hyaluronan biosynthesis in the renal medullary interstitial tissue involved in the mechanism of urine osmotic concentration.

**Key words:** *kidney, renal corpuscle, Brattleboro rats, prenatal ontogenesis*

Department of Physiology, Novosibirsk State University