

АНАТОМО-МОРФОМЕТРИЧНІ КРИТЕРІЇ СЕЛЕЗІНКИ СТАТЕВОЗРІЛИХ *GALLUS GALLUS*, *FORMA DOMESTICA* L., *COLUMBIA LIVIA* G., *COTURNIX COTURNIX* L.

О.Ф. Дунаєвська*

Житомирський національний агроекологічний університет, Київ, Україна

*Corresponding author: oksana_fd@ukr.net

Received 22 October 2018; Accepted 13 December 2018

Проблематика. Селезінка як важливий орган імуногенезу чутлива до змін зовнішнього і внутрішнього середовища. Цю властивість використовують у біомоніторингу довкілля. Значення морфологічних досліджень селезінки зростає із захворюваннями птахів, збудники яких становлять загрозу здоров'ю і життю людини. Вони необхідні для отримання якісної та безпечної продукції птахівництва. Праці з морфометричного вивчення селезінки птахів мають фрагментарний характер. Тому актуальне комплексне анатомічне, морфометричне вивчення селезінки птахів.

Мета. Встановлення морфометричних критеріїв селезінки птахів у нормі: відносної маси, відносних площ білої та червоної пульпи, опорно-скоротливого апарату, імунорегуляторного індексу.

Методика реалізації. Анатомічні дослідження селезінки з визначенням топографії, лінійних значень. Імуногістохімічні, гістологічні та цитологічні дослідження мікро- й ультрамікроскопічного рівня після фіксації матеріалу у формаліні або глютаровому альдегіді. Фарбування гістопрепаратів здійснювали гематоксиліном Ерліха й еозином та за методами Браше і Ван Гізона. Субпопуляції лімфоцитів виявляли за допомогою мишачих моноклональних антитіл. Морфометричні визначення відносної площі структурних компонентів селезінки та співвідношень між ними у статевозрілих голуба, курки, перепілки.

Результати. Відносна маса селезінки дорівнює $0,022 \pm 0,008$ % у голуба; $0,138 \pm 0,01$ % у курки; $0,121 \pm 0,03$ % у перепілки. Радіальні трабекули в селезінці курки відсутні, в голуба та перепілки розвинені слабо. Відносна площа опорно-скоротливого апарату селезінки становить $9,21 \pm 3,40$ % у голуба; $3,02 \pm 0,95$ % у курки та $4,25 \pm 0,95$ % у перепілки. Відносна площа білої пульпи селезінки займає $18,68 \pm 3,75$ % у курки, $14,38 \pm 2,58$ % у перепілки та $14,93 \pm 6,14$ % у голуба. Лімфоцити CD4+ та CD8+ локалізувалися переважно в періартеріальних лімфоїдних піхвах. Лімфоцити CD19+ та CD20+ сконцентровані в лімфоїдних вузликах, у пульпі домінували CD20+-клітини. Ультрамікроскопічною особливістю селезінки перепілки є великі ядра у клітинах пульпи; у голуба порівняно з іншими птахами більша кількість аутофагосом у лімфобластах; у курки ендотеліальні клітини мають добре розвинені органели метаболічного типу.

Висновки. Співвідношення білої пульпи до червоної дорівнювало 1:4,91 у голуба, 1:4,19 у курки та 1:5,66 у перепілки. Імунорегуляторний індекс пульпи дорівнював 2,00 у голуба; 1,85 у курки; 1,73 у перепілки. Отримані морфометричні критерії селезінки птахів у нормі є підставою для подальших досліджень впливу чинників довкілля, мікроорганізмів, фармакологічних препаратів для розробки тест-системи органа в нормі.

Ключові слова: селезінка; голуб; курка; перепілка; анатомія; морфометрія; ультраструктура; імуногістохімія.

Вступ

Селезінка – один із найважливіших вторинних органів імуногенезу. Вона відрізняється від решти органів цієї групи своєю структурою. Її відмінність пояснюється поєднанням ознак органа гемопоезу та імунної системи. Вона займає центральне місце в контролі антигенного складу крові та початку імунної відповіді, виконує фільтраційну, очисну, імунну, кровотворну, депонувальну функції тощо [1–3].

У той же час, незважаючи на значну роль селезінки як поліфункціонального органа орга-

нізму людини й тварин, її морфологія вивчена недостатньо. Тривають анатомічні та філогенетичні дослідження селезінки [4, 5], у т.ч. морфометричні [6], результати яких широко впроваджуються в медичну практику [7]. Селезінка чутлива до змін, які відбуваються у зовнішньому або внутрішньому середовищах, тому її використовують у біомоніторингу довкілля [8], за впливу інфекційного процесу [9–12], оскільки деякі збудники становлять загрозу здоров'ю та життю людини [11]. Небезпечним є використання продуктів птахівництва, забруднених залишковими кількостями антибіотиків; у цілому

проблема якості та безпеки харчових продуктів є міжнародною [13]. Саме тому триває вивчення селезінки птахів на клітинному та ультрамікроскопічному рівні [14–19].

Мета нашого дослідження – з'ясувати анатомічні, гісто-, цитохімічні особливості селезінки класу Птахи для розробки тест-системи органа в нормі.

Матеріали і методи

Роботу виконували впродовж 2012–2018 рр. на кафедрі анатомії і гістології Житомирського національного агроекологічного університету. Матеріал для дослідження відбирали у СТВ “Птахівник”, с. Токарів Новоград-Волинського району Житомирської обл. (кури), ФГ “Миколай”, с. Барашівка Житомирського району (перепілки, голуби), ПОСТ “Надія”, с. Зарубинці Андрушівського району Житомирської обл. (кури), ТОВ “Профуна”, с. Сінгури Житомирського району (кури).

Перед відбором тварин для дослідження проводили клінічне та загальне гематологічне обстеження. Тварин класу Aves – Птахи (*Gallus gallus, forma domestica L.*, 1758 – домашня курка; *Columbia livia G.*, 1789 – голуб сизий; *Coturnix coturnix L.*, 1758 – перепілка звичайна) підбирали за принципом аналогів за породою, віком, статтю, масою. Анатомічний розтин проводили методом повної евісцерації.

Селезінку відбирали у статевозрілих тварин обох статей у співвідношенні 1:1 у фазі морфофункціональної зрілості органа: голуба сизого (вік 10–14 місяців), курки домашньої породи полтавська глиняста (19–20 тижнів), перепілки звичайної (вік 7–8 тижнів) кількістю 18; 26; 14 відповідно. Маса тварин становила: 243,64 ± 4,28 г (голуб), 1261,59 ± 7,42 г (курка), 149,008 ± 3,78 г (перепілка).

Зважування тварин проводили з точністю до 0,01 г на лабораторних вагах PS 1000/C/2.

Відносну масу (ВМ) селезінки обчислювали за формулою

$$BM = \frac{AC}{MT} \cdot 100 \%,$$

де AC – маса селезінки, г; MT – маса тварини, г.

Лінійні параметри органа (ширину, довжину та висоту) визначали в міліметрах прямим вимірюванням. Індекс розвитку селезінки (ІРС) обчислювали за формулою

$$IRS = \frac{ШС}{ДС} \cdot 100 \%,$$

де ШС – ширина органа, мм, ДС – довжина органа, мм.

Для гістологічних досліджень шматочки матеріалу фіксували в 10–12 %-ному охолодженому розчині нейтрального формаліну. Фіксований у формаліні матеріал для подальших досліджень промивали проточною водопровідною водою впродовж 24–48 год. Потім зневоднювали в етиловому спирті зростаючої міцності – 40°, 70°, 96°, 100°, заливали у парафін за схемою, запропонованою в посібнику Л.П. Горальського зі співавторами (2011). Парафінові зрізи виготовляли на санному мікромомі МС-2. Товщина зрізів не перевищувала 4–10 мкм. Для характеристики морфології клітин і тканин застосовували фарбування гематоксиліном Ерліха й еозинном та за методами Браше і Ван Гісона [20].

Вимірювання мікроструктур селезінки виконували за допомогою лінійки окуляр-мікрометра та морфометричної сітки (квадратно-сіткові вставки) Горяєва мікроскопа Мігрос МС-50 та мікроскопа МБС-10 з постійною довжиною тубуса. Для стереометричного аналізу гістоструктур застосовували стереологічну методику крапкової волюметрії. В усіх тварин за однакового збільшення підраховували кількість квадратів, зайнятих досліджуваною гістоструктурою, і зіставленням її площі, займаної на поверхні зрізу, із загальною визначали відсоткове співвідношення необхідного показника. Морфометричні дослідження здійснювали за допомогою програми “Master of Morphology” з точністю до 0,1 мкм. Виміри товщини сполучнотканинних капсул, діаметра лімфоїдних вузликів та їх структурних одиниць, довжину, ширину трабекул, товщину стінок судин здійснювали окуляр-мікрометром МОВ-1-15 (по 15 вимірів з кожного гістозрізу, по 3 препарати від кожної тварини).

Мікрофотографування гістологічних препаратів здійснювали за допомогою відеокамери САМ V-200, вмонтованої у мікроскоп Мігрос МС-50 та підключеної до персонального комп'ютера.

На основі отриманих даних визначали важливі показники морфофункціонального стану селезінки: відносну площу (ВП) білої пульпи (БП), червоної пульпи (ЧП), лімфоїдних вузликів (ЛВ), періартеріальних лімфоїдних піхв (ПАЛП), опорно-скоротливого апарату (ОСА), судин – у відсотках; товщину капсули, трабекул, діаметр ЛВ, періартеріальної зони (ПаЗ) – у мікрометрах. Ці величини використовували для обчислення співвідношень

основних структурних компонентів селезінки та їх складових.

Субпопуляції лімфоцитів виявляли за допомогою моноклональних антитіл (датської фірми “ДАКО”) та системи візуалізації. Визначали їх розміщення, вміст (абсолютну і відносну кількість), кількісне співвідношення популяцій та імунорегуляторний індекс (ІРІ) як відношення кількості клітин CD4⁺ до клітин CD8⁺ у полі зору мікроскопа (окуляр 10, об’єктив 40). Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою системи детекції DAKO EnVision FLEX+ (“ДАКО”, Данія). Для візуалізації гістологічної структури досліджуваної тканини оброблені імуногістохімічні препарати додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1–3 хв (“ДАКО”), після чого забарвлені зрізи поміщали у середовище Eukitt (Німеччина). Вивчення препаратів проводили на мікроскопі Olympus AX70 (Японія) з цифровою відеокамерою Olympus DP50, з’єднаною з ПК. При цьому визначали вміст, розміщення і кількість субпопуляцій лімфоцитів (на умовну одиницю площі, окуляр 10, об’єктив 40). Показники експресованих маркерів вивчали на 10 випадково вибраних полях зору мікроскопа гістологічних зрізів за збільшення у 400, 600, 800 та 1000 разів.

Для електронномікроскопічного дослідження забір матеріалу проводили відразу після розтину грудочеревної порожнин. Довжина відібраних зразків не перевищувала 1 мм. Матеріал переносили пастерівською піпеткою і фіксували 2,5 %-ним розчином глютарового альдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією у 1 %-ному розчині оксиду осмію (IV) за Колфільдом. Потім матеріал зневоднювали у спиртах зростаючої міцності (70°, 80°, 90°, 100°) та ацетоні, заливали у суміш епон-аралдит, згідно із загальноприйнятою методикою [20]. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультратомі Reihart (Австрія), контрастували 2 %-ним розчином ураніацетату та цитратом свинцю і досліджували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К за збільшень у 4–20 тис. разів. Морфометричні дослідження проводили на напівавтоматичному пристрої обробки графічних досліджень за допомогою програми “Органела”. При цьому вивчали клітинний склад, його особливості та основні морфометричні характеристики.

Цифрові дані морфометричних досліджень обробляли за допомогою варіаційно-статистичних методів на персональному комп’ютері з використанням програми Statistica 6.0 для Windows XP.

Під час проведення досліджень дотримувались основних правил належної лабораторної практики GLP (1981 р.), положень “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених I Національним конгресом з біоетики (м. Київ, 2001 р.). Уся експериментальна частина дослідження була проведена згідно з вимогами міжнародних принципів “Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експерименті та інших наукових цілях” (Страсбург, 1986 р.) та згідно з “Правилами проведення робіт з використанням експериментальних тварин”, затвердженими наказом МОЗ № 281 від 1 листопада 2000 р. “Про заходи щодо подальшого удосконалення організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин”, і відповідним Законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (№ 3447-IV від 21.02.2006 р., м. Київ). Протокол досліджень схвалено комісією з біоетичної експертизи і дозволено у Житомирському національному агроєкологічному університеті.

Результати

Згідно з анатомічними дослідженнями, довжина органа у голуба сизого становила $1,64 \pm 0,05$ см, ширина – $2,05 \pm 0,25$ мм, висота – $2,50 \pm 0,415$ мм. При цьому ІРС становив $12,5 \pm 1,21$ %, тому форма селезінки визначається як сильно видовжена. Абсолютна маса селезінки становила $0,0536 \pm 0,0044$ г, ВМ – $0,022 \pm 0,008$ %.

Мікроскопічна будова селезінки голуба сизого була сформована стромою і паренхімою. Строма була утворена капсулою і трабекулами, які разом формували ОСА селезінки. Мікроскопічно селезінка оточена серозною оболонкою, яка щільно зросталася з капсулою. Серозна оболонка у своєму складі містила тонкі колагенові волокна і шар мезотелію. Капсула складалася з двох шарів: зовнішнього (еластичного) та внутрішнього (м’язового). У сполучній тканині капсули домінували еластичні волокна, поміж яких містилися колагенові волокна і фіброласти. Серед нижніх колагенових волокон були також помітні темні ядра фіброцитів.

ОСА селезінки був утворений щільною волокнистою сполучною тканиною з колагеновими і еластичними волокнами та пучками гладких м’язових клітин. Капсула селезінки рівномірно розвинена, проте її товщина в різних ділянках органа неоднакова. Найбільшого

розвитку вона набула у воротах органа і досягала там товщини до 30,25 мкм. Водночас потовщення капсули зустрічалися по всій її поверхні і становили, відповідно, від 18,47 до 24,75 мкм. Проте на вісцеральній поверхні селезінки товщина капсули була найменшою – 11,13 мкм. При цьому середнє значення товщини капсули селезінки голуба сизого становило $19,25 \pm 3,89$ мкм.

Згідно з гістологічним дослідженням препаратів, які були забарвлені гематоксиліном та еозином, і особливо за методом Ван-Гізона, трабекулярний апарат селезінки голуба помірно розвинений. Трабекули мали переважно видовжену та овальну форму. Виявляли судинні, радіальні та сполучні трабекули. Поодинокі сполучні трабекули розташовувались у ЧП нерівномірно, вони мали невеликі розміри та часто з'єднувались із судинними трабекулами. Радіальні трабекули зустрічались рідко та мали видовжену форму, подекуди вони розташовувались паралельно капсулі. Інколи в окремих ділянках гістопрепаратів пульпарні трабекули окреслювали ЛВ (рис. 1).

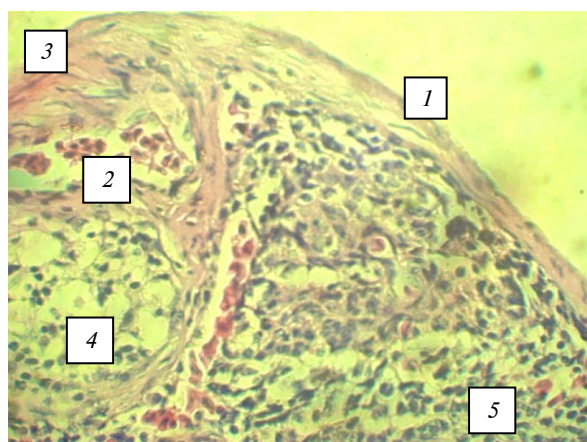


Рисунок 1: Фрагмент мікроскопічної будови селезінки голуба сизого: 1 – капсула; 2 – трабекула; 3 – потовщення капсули; 4 – лімфоїдний вузлик; 5 – червона пульпа. Гематоксилін та еозин; $\times 80$

Згідно з морфометричними дослідженнями, довжина трабекул становила $121,0 \pm 74,74$ мкм, ширина – $53,17 \pm 18,29$ мкм, найкраще була розвинена мережа судинних трабекул. У них

виявляли артеріоли та венули. Інколи в одній судинній трабекулі налічувалось аж до 5 судин. Довжина таких трабекул селезінки голуба сизого становила $130,63 \pm 61,77$ мкм, ширина – $50,88 \pm 9,36$ мкм, а їх частка від загальної кількості трабекулярного апарату становила 89,03 %. У всіх трабекулах (судинних, радіальних, сполучних) пучки міоцитів розвинені слабо. Загалом відносна площа ОСА селезінки, згідно з морфометричними дослідженнями, становила майже десяту частину від загальної її площі (таблиця), у тому числі частка капсули становила 30,84 %.

Паренхіма селезінки голуба сизого утворена БП і ЧП (див. рис. 1), основою яких є ретикулярна тканина з ретикулярними волокнами. Ретикулярна строма складається з фібробластів, макрофагів, колагенових і еластичних волокон. Колагенові волокна розташовуються переважно навколо судин і майже відсутні в пульпі. Еластичні волокна, крім капсули, містяться в стінках великих судин. Чітка межа між білою та червоною пульпами селезінки у голуба відсутня. Водночас їх розділяв подвійний шар дещо сплюснутих ретикулярних клітин із вираженими відростками, що надавав структурі сітчастої форми. У складі пульпи виділяли ЛВ (див. рис. 1) і ПАП, останні розташовувались навколо пульпарних артерій. За формою ЛВ в основному були округлі, овальні, видовжені. У пульпі вони розташовувались нерівномірно, інколи без чітких меж переходили в ЧП. Відзначали локалізацію ЛВ і в підкапсулярній зоні. Інколи вони утворювалися групами, в кількості до 6 вузликів. Характерною ознакою селезінки в голуба сизого є наявність неформованої лімфоїдної тканини неправильних розмірів різної форми.

Аналіз гістологічних досліджень на цитологічному рівні показує, що в ретикулярній тканині БП селезінки виявляли клітини крові різного ступеня зрілості, які розташовувались як хаотично, так і невеликими групами з 2-3 клітин. Іноді між клітинами ЛВ зустрічались мієлоїдні елементи. Так, у БП виявляли лімфоцити, які чітко поділялись на великі та

Таблиця: Основні морфометричні показники селезінки птахів

| Вид тварини | Відносна маса, % | Відносна площа, % | | |
|-------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------------|
| | | Біла пульпа | Червона пульпа | Опорно-скоротливий апарат |
| Голуб | $0,022 \pm 0,008$ | $14,93 \pm 6,14$ | $73,30 \pm 8,59$ | $9,21 \pm 3,40$ |
| Курка | $0,138 \pm 0,01$ | $18,68 \pm 3,75$ | $78,30 \pm 1,98$ | $3,02 \pm 0,95$ |
| Перепілка | $0,121 \pm 0,03$ | $14,38 \pm 2,58$ | $81,37 \pm 3,17$ | $4,25 \pm 0,95$ |

малі, одноядерні та багатоядерні макрофаги, що містили включення гемосидерину та пігмент – меланін. Лейкоцити, які знаходились у БП, переважно були еозинофільними. Особливістю БП селезінки також є щільне розташування клітин і волокон та наявність дендритних макрофагів.

Згідно з результатами морфометричних досліджень, діаметр ПАЛП селезінки голуба сизого становив $49,80 \pm 13,12$ мкм, ЛВ – $99,60 \pm 30,85$ мкм. Як правило, у ЛВ світлі центри були відсутні, проте у них була чітко визначена ПаЗ діаметром $19,37 \pm 3,91$ мкм. Загалом БП селезінки займає більшу відносну площу органа, ніж ОСА (див. таблицю). ЛВ належала більша частка БП – $8,81 \pm 4,57$ %, дещо меншу частку займали ПАЛП $6,12 \pm 3,29$ %, а співвідношення ЛВ до ПАЛП становило 1:0,70. Лімфоїдна тканина розташовувалась не лише у пульпі, а й у підкапсулярній зоні. ЧП містила значну кількість еритроцитів, що надавали їй червоного забарвлення, макрофагів та кров'яних судин і займала найбільшу ВП селезінки (див. таблицю). Макрофаги утворювали скупчення навколо великих судин у центральній зоні селезінки. Проведені нами гістометричні дослідження показали, що відносна площа судинного апарату селезінки голуба сизого становила $2,57 \pm 1,76$ %, співвідношення БП і ЧП було 1:4,91, а співвідношення ОСА і пульпи – 1:9,58.

Згідно з проведеними нами органометричними дослідженнями, довжина селезінки курки становить $2,13 \pm 0,12$ см, ширина – $1,45 \pm 0,40$ см, висота – $1,20 \pm 0,008$ см. Відповідно, ІРС у курки становить $68,08 \pm 1,86$ %, у перепілки – $63,29 \pm 2,18$ %, тому форма селезінки визначається як округла, еліпсоподібна. Абсолютна маса селезінки курки становила $1,741 \pm 0,224$ г, відносна – $0,138 \pm 0,01$ % і була меншою, ніж ВМ селезінки голуба, майже в 1,6 разу, проте більшою в 1,14 разу, відповідно, за показники ВМ селезінки перепілки (див. таблицю).

Мікроскопічна будова селезінки курки і перепілки також характеризувалась наявністю строми і паренхіми, які мали схожі характеристики з голубом. Також товщина капсули селезінки курки і перепілки була в різних ділянках органа неоднаковою, найбільше вона розвинена у воротах селезінки, де досягає значення $173,25$ мкм у курки. Водночас потовщення капсули зустрічались на всій поверхні органа і становили від $98,36$ до $137,26$ мкм у курки. Проте на вісцеральній поверхні селезінки тов-

щина капсули була найменшою – $11,30$ мкм у курки та $6,53$ мкм у перепілки. При цьому середнє значення товщини капсули селезінки курки становило $66,33 \pm 37,04$ мкм, перепілки – $17,39 \pm 2,74$ мкм. Частка капсули в курки становила $21,52$ %.

Трабекули курки і перепілки були видовженими та овальними. Поодинокі сполучні трабекули розташовувались у ЧП нерівномірно та мали невеликі розміри. У центральній ділянці пульпи селезінки судинні артерії були добре розвиненими. У курки їх довжина становила $25,6 \pm 7,09$, ширина – $19,81 \pm 6,13$ мкм. Найкраще була розвинена мережа великих судинних трабекул, у яких виявляли артеріоли та вени. У курки їх довжина в середньому становила $232,65 \pm 59,51$ мкм, ширина – $77,18 \pm 21,79$ мкм. Частка судинних трабекул становила $74,68$ % від загальної кількості трабекул пульпи курки. У всіх трабекулах пучки міоцитів розвинені слабо. Проте слід зазначити, що радіальні (капсулярні) трабекули в селезінці курки відсутні. Загалом відносна площа ОСА селезінки в курки була майже втричі, у перепілки вдвічі меншою за ВП ОСА голуба (див. таблицю).

Паренхіма селезінки курки і перепілки представлена БП і ЧП (рис. 2), без чітких меж. Гістологічна характеристика схожа з такою у голуба. ВП БП селезінки курки і перепілки більша за ВП БП голуба (див. таблицю). Навколо центральної артерії ЛВ була сконцентрована ПаЗ (див. рис. 2) діаметром $22,36 \pm 3,12$ мкм у курки. Слід відзначити, що у курки, перепілки, як і в голуба, у ЛВ світлий центр відсутній. ЛВ належала більша частка БП. Співвідношення ЛВ і ПАЛП дорівнювало 1:0,56 у курки та 1:0,49 у перепілки. ВП ЧП домінувала в структурі селезінки всіх досліджуваних птахів (див. таблицю).

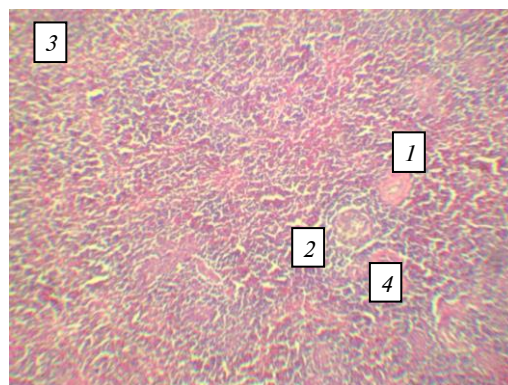


Рисунок 2: Фрагмент мікроскопічної будови пульпи селезінки курки: 1 – періартеріальна лімфоїдна піхва, 2 – лімфоїдний вузлик, 3 – червона пульпа, 4 – періартеріальна зона. Гематоксилін та еозин; $\times 56$

Електронномікроскопічне дослідження селезінки курей показало, що у білій пульпі селезінки в центрі ЛВ розміщені лімфобласти з великим округлим ядром, яке містить еухроматин і ядерця великих розмірів (рис. 3).

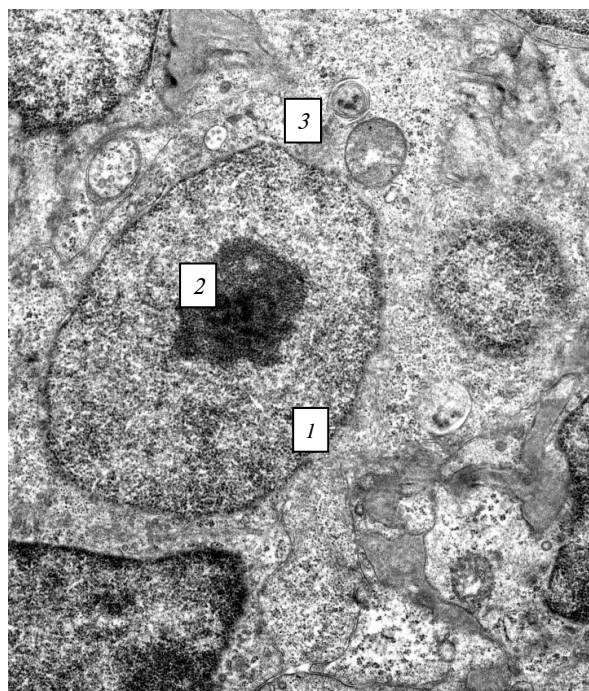


Рисунок 3: Фрагменти білої пульпи селезінки курки: 1 – лімфобласти, 2 – ядрець, 3 – аутофагосоми; $\times 8000$

Це свідчить про високу метаболічну активність цих клітин, а великий розмір ядрець вказує на інтенсивне формування субодиноць рибосом із подальшим їх утворенням у цитоплазмі клітин з метою синтезу ними білків для організації органел. Тому в таких клітинах, як правило, переважають рибосоми, а незначна кількість мітохондрій, яка міститься у цитоплазмі цих клітин, забезпечує енергією процеси диференціювання. Слід відзначити і наявність у лімфобластах аутофагосом, утворення яких є результатом активації убіквітин-протеосомальної системи, що пов'язано з наявністю у цих клітинах аномальних білків. Останні, очевидно, знешкоджуються у самих клітинах, а також виводяться з них за допомогою мультівезикулярних каналців, що формують двоконтурну мембрану аутофагосом і виводять їх за межі клітини. Такі ланцюжки везикул також можуть формувати канали для більш інтенсивного обміну речовин. Периферично від центра ЛВ селезінки розміщуються більш зрілі імунокомпетентні клітини: лімфоцити (В і Т), макрофаги та дозріваючі плазмоцити. У трабе-

кулах селезінки розміщені кровоносні судини, зокрема пре- та посткапіляри. Перші обмежені 5–7 ендотеліальними клітинами, у яких добре розвинені органи метаболічного типу та мікропіноцитозні пухирці, що забезпечують трансендотеліальний транспорт речовин.

За нашими ультрамікроскопічними дослідженнями, селезінка голуба, а саме ультрамікроскопічна будова ЛВ БП, подібна до такої у курки. Разом із тим у лімфобластах і клітинах, які диференціюються (лімфоцити, макрофаги), зростає кількість аутофагосом і лізосом. Частина лімфоцитів підлягає апоптозу, утворюючи апоптозні тільця, які потім поглинаються макрофагами. Кількість таких тілець у голубів дещо більша порівняно з іншими птахами (рис. 4).

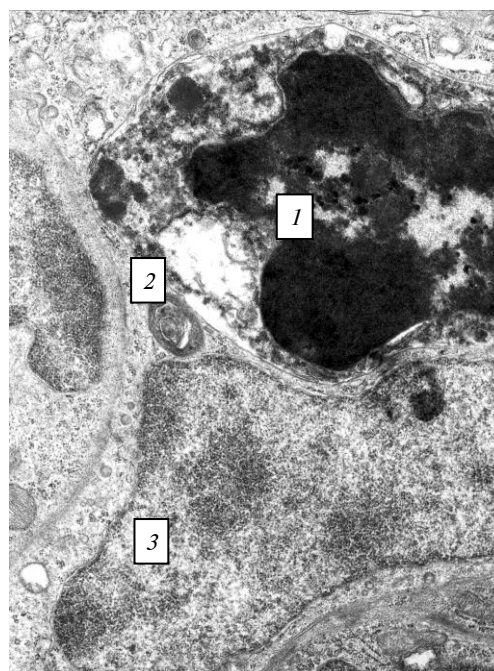


Рисунок 4: Фрагменти білої пульпи селезінки голуба: 1 – апоптозні тільця, 2 – аутофагосома, 3 – ретикулярна клітина; $\times 8000$

До того ж Т-лімфоцити розміщуються переважно в ПаЗ ЛВ і супроводжуються інтердигітними-антигенопрезентуючими клітинами, які спричиняють їх проліферацію та дозрівання. У ЛВ селезінки на периферії виявляють не тільки лімфоцити, а й еритроцити та еозинофіли. Крім того, з'ясовано, що особливостями артеріол селезінки голуба є те, що їхня внутрішня стінка має ендотеліальне вистилання з 8–12 ендотеліоцитів, які з'єднанні простими адгезивними контактами із зонами злипання.

Детальна характеристика ультраструктурної організації селезінки перепілки вказує на деякі відмінності її ультрамікроскопічної будови відносно селезінки голуба, а особливо курки. Зазвичай ядра майже всіх клітин БП селезінки перепела містять надто великі ядра, що, очевидно, можна пояснити більшою кількістю клітин на стадії мітотичного ділення і необхідністю збільшення субодиноць рибосом для синтезу ними білків та утворення органел у зрілих клітин селезінки перепела порівняно з попередньо дослідженими птахами. Найбільших розмірів ядра досягають у плазматичних клітинах, які, як відомо, виробляють гамма-глобуліни. Таке збільшення розмірів ядерець у клітинах селезінки перепілки характерне не тільки для лімфоцитів, а й для диференційованих лімфоцитів, плазмоцитів, макрофагів і деяких фіброblastів (рис. 5). Більша частина таких клітин розміщена у ПаЗ і периферичних зонах БП. У прошарках пухкої волокнистої тканини зустрічаються фіброblastи у досить активній формі, з добре розвиненою гранулярною ендоплазматичною сіткою, також присутні ретикулярні клітини, лімфоblastи та лімфоцити, переважно Т-лімфоцити, які мають невелику кількість цитоплазми та поодинокі мітохондрії. Деякі ендотеліоцити центральної артерії ЛВ селезінки виконують фагоцитарну функцію і

накопичують у цитоплазмі аутофагосоми, що трансформуються в залишкові тільця, включаючи ліпіди, і формують ліпофусциновий пігмент.

У ЧП селезінки перепілки переважають венозні синуси. Їх ендотелій може брати участь у фагоцитозі, на що вказує наявність у ньому аутофагосом і залишкових тілець.

За результатами наших імуногістохімічних досліджень встановлено, що субпопуляції лімфоцитів із кластерами CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ у пульпі селезінки голуба, курки розміщувались поодинокі та дифузні, найчастіше утворювали ланцюги або скупчення (рис. 6, 7). Кількість лімфоцитів CD4+ у ПАП селезінки від загальної кількості популяції пульпи становила 64,44 % у голуба, 75,4 % – у курки, 69,36 % – у перепілки. Решта лімфоцитів CD4+ розташовувалась у ЛВ та ЧП. Частка лімфоцитів CD4+ у ЛВ від загальної кількості пульпи становила в курки 20,87 %, у голуба – 34,6 %, у перепілки – 29,7 %. Клітини CD8+ локалізувались переважно у птахів у ПАП. Зокрема, у ПАП БП їх кількість становила 60,97 % – у голуба, 64,79 % – у перепілки і 76,81 % – у курки, решта (30,73; 35,21 і 15,93 % відповідно) – у ЛВ БП. У ЧП селезінки їх кількість не перевищувала 4,45 % у голуба, 4,03 % – у перепілки, 2,8 % – у курки. При цьому ІРІ пульпи селезінки дорівнював 2,00 у голуба; 1,85 – у курки; 1,73 – у перепілки.

Серед популяцій В-лімфоцитів пульпи селезінки птахів переважали CD20+-лімфоцити порівняно з CD19+ у зонах ПАП, ЛВ відповідно, у 2,98 і 1,43 рази в голуба; в 2,4 і 1,47 рази в курки; в 2,6 і 1,4 рази в перепілки. Найбільша кількість CD19+ і CD20+-лімфоцитів знаходилась у ЛВ, менша – у ПАП і у ЧП селезінки птахів. У червоній пульпі вони розташовувались дифузні. У періартеріальних лімфоїдних піхвах кількість лімфоцитів CD19+ становила лише 10,55 % від загальної кількості цитопопуляції БП у голуба; 10,31 % – у курки та 10,61 % – у перепілки. А за абсолютними значеннями кількість CD19+ у ЛВ селезінки голуба налічувала $1,14 \pm 3,09$ шт. на од. пл., у ПАП – $4,43 \pm 0,90$ шт. на од. пл. та в ЧП $6,43 \pm 2,27$ шт. на од. пл. Кількість CD20+ налічувала, відповідно, в ЛВ $45,57 \pm 8,41$ шт. на од. пл., в ПАП – $13,20 \pm 1,19$ шт. на од. пл. та в ЧП $15,14 \pm 3,23$ шт. на од. пл. Така різниця пояснюється тим, що CD19+-лімфоцити знаходяться на найбільш ранніх етапах розвитку, а CD20+ – на стадіях диференціації В-клітин.

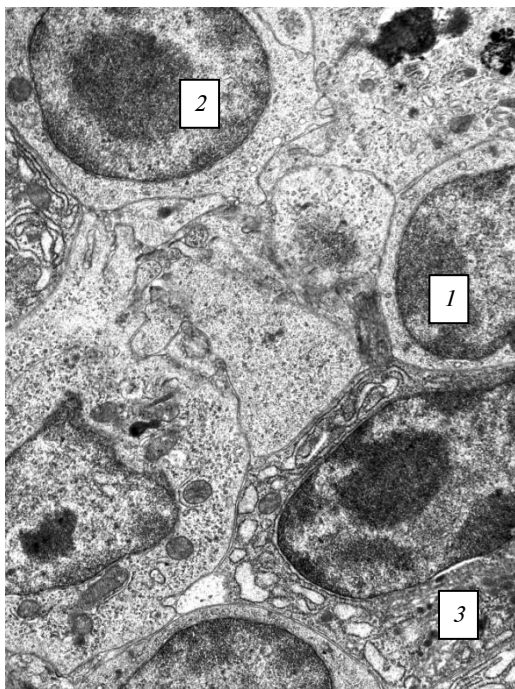


Рисунок 5: Фрагменти білої пульпи селезінки перепілки: 1 – лімфоblast, 2 – ядрець, 3 – плазматична клітина; $\times 5000$

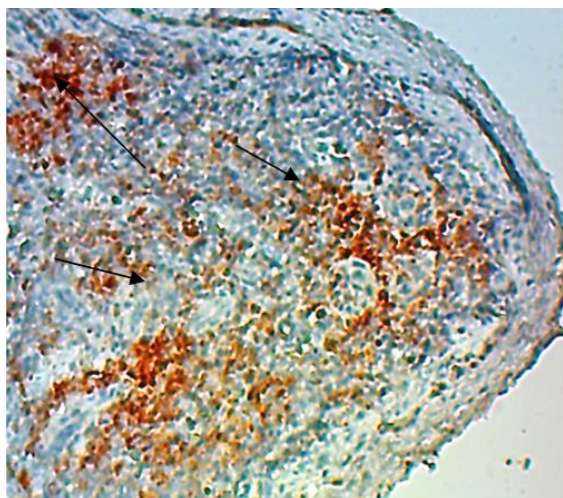


Рисунок 6: Скупчення CD20+ лімфоцитів у лімфоїдній тканині підкапсулярної зони селезінки голуба. Гематоксилін із додатковим дофарбовуванням гематоксиліном Майєра; $\times 120$

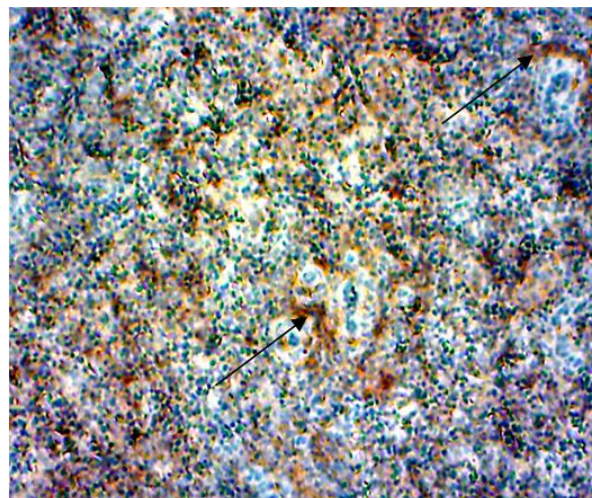


Рисунок 7: Ланцюгове розташування CD19+ лімфоцитів навколо періартеріальної зони білої пульпи в селезінці курки. Гематоксилін із додатковим дофарбовуванням гематоксиліном Майєра; $\times 120$

Обговорення

Анатомічні дослідження узгоджуються з результатами інших науковців, зокрема з отриманими при дослідженні селезінки курки [21]. За результатами наших досліджень, у складі БП селезінки птахів ми виділяли лімфоїдні вузлики і періартеріальні лімфоїдні піхви. На наявність у пульпі селезінки курей лімфоїдних вузликів вказується в інших наукових працях [11]. Згідно з нашими дослідженнями, у лімфоїдних вузликах селезінки світлий центр відсутній, навколо центральної артерії вузлика знаходилась ПаЗ. Проте деякі дослідники вказують на наявність у перепілки і курки маргінальної зони [22]. Згідно з морфометричними дослідженнями Т.І. Лапиної, О.І. Токарева (2011) [23], відносна площа ЛВ у курей становить 4,94 %, що дещо відрізняється від наших результатів і, можливо, зумовлено віковими особливостями (60-тижневий вік) та породними (лінія кросу РООС-308), умовами утримання (Ставропольський край). Ми у своїх дослідженнях, які збігаються з даними Ю.А. Фіногенової, Е.В. Зайцевої (2009) [12], у ЧП селезінки курей виявляли велику кількість еритроцитів, що може свідчити про депонування клітин крові. Описана нами структурна організація селезінки перепілки підтверджується результатами досліджень інших науковців [24, 25].

Імуногістохімічні дослідження проводять у медицині та започатковують у ветеринарній медицині для продуктивних тварин. Тому перспективними та необхідними для вивчення

імуноморфології селезінки є імуногістохімічні дослідження, які дають змогу вивчати розподіл Т- і В-лімфоцитів різних кластерів. Науковими працями С.В. Гуральської (2016) встановлено подібні дані щодо ІРІ в курей. Так, за її результатами, у 110-добових курей ІРІ був більше 1 і дорівнював $1,76 \pm 0,05$ [26]. Оскільки селезінка курки є найбільшим вторинним лімфоїдним органом, електронномікроскопічні дослідження проводяться від одноденного віку птахів, які узгоджуються з нашими дослідженнями: виявлено макрофаги, ретикулярні клітини [27].

Висновки

ІРС у курки становить $68,08 \pm 1,86$ %, у перепілки – $63,29 \pm 2,18$ %, тому форма селезінки визначається як округла, еліпсоподібна; у голуба ІРС – $12,5 \pm 1,21$ %, що свідчить про сильно видовжену форму органа. ВМ селезінки голуба найменша серед досліджуваних птахів – $0,022 \pm 0,008$ %; найбільша в курки – $0,138 \pm 0,01$ %; ВМ селезінки перепілки має проміжне значення – $0,121 \pm 0,03$. Селезінки птахів мають однакову мікроскопічну будову, проте відрізняються морфометричними показниками. Радіальні трабекули в селезінці курки відсутні, у голуба та перепілки розвинені слабо. Відносна площа ОСА селезінки найбільша в голуба – $9,21 \pm 3,40$ %; найменша в курки – $3,02 \pm 0,95$ %. БП селезінки курки належить $18,68 \pm 3,75$ % відносної площі селезінки, $14,38 \pm 2,58$ % у перепілки та $14,93 \pm 6,14$ % у голуба. ІРІ пульпи селезінки дорівнював 2,00 у го-

луба; 1,85 у курки; 1,73 у перепілки. Ультра-мікроскопічною особливістю селезінки перепілки є великі ядра в клітинах пульпи, у голуба порівняно з іншими птахами більша кіль-

кість аутофагосом у лімфобластах, у курки ендотеліальні клітини мають добре розвинені органели метаболічного типу.

References

- [1] Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 2013;39(5):806-18. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.10.010
- [2] Vishnevskaya TYa, Abramova LL. Dynamics of the morphofunctional state of the rabbit spleen as an indicator of stress and immunocorrection with Roncoleukin. *Izvestiya Orenburgskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta*. 2013;6(44):222-4.
- [3] Zhang Q, Chen B, Yang P, Zhang L, Liu Y, Ullah S, et al. Identification and structural composition of the blood-spleen barrier in chickens. *Veterinary J*. 2015;204(1):110-6. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.01.013
- [4] Gaivoronsky IV, Kotiv BN, Alekseev VS, Nichiporuk GI. Variant anatomy of ligaments of spleen and arteries passing through them. *Morfologiya*. 2015;2:38-43.
- [5] Udroui I, Sgura A. The phylogeny of the spleen. *Quarterly Rev Biol*. 2017;92(4):411-43. DOI: 10.1086/695327
- [6] Vozgoment OV, Pykov MI, Zaytseva NV, Akatova AA, Ivashova YA, Chigvintsev VM. A new ultrasonic criterion of evaluating spleen dimensions in children and determination of the range of normal organ's dimensions. *Pediatric Pharmacology*. 2014;11(3):89-92. DOI: 10.15690/pf.v11i3.1016
- [7] Wojciechowski VV, Govorov ND. Differential diagnosis of splenomegaly. *Novyye Sankt-Peterburgskiyе Vrachebnyye Vedomosti*. 2018;1:23-38.
- [8] Dunaievskaya OF. Morphological changes of the spleen under the influence of various factors. *Journal of VN Karazin Kharkiv National University Ser Biology*. 2016; 27:106-24.
- [9] Singh A, Bekele A, Patnayak D, Jindal N, Porter R, Mor S, et al. Molecular characterization of quail bronchitis virus isolated from bobwhite quail in Minnesota. *Poultry Sci*. 2016;95(12):2815-18. DOI: 10.3382/ps/pew217
- [10] Xue M, Zhao Y, Hu S, Shi X, Cui H, Wang Y. Analysis of the spleen proteome of chickens infected with reticuloendotheliosis virus. *Arch Virol*. 2017;162(5):1187-99. DOI: 10.1007/s00705-016-3180-5
- [11] Gromov IN, Selikhanova MK, Aliyev AS, Burlakov MV, Taymasukov AA. Pathological changes in chickens with associative course of infectious anemia and infectious bursal disease. *Veterinarnaya Patologiya*. 2012;3:38-44.
- [12] Finogenova YuA, Zaitseva YeV. Adaptive transformations of the spleen of broiler chickens to chlorella suspension in a changing environment. *Vestnik Sankt-Peterburga*. 2009;14(3):124-7.
- [13] Fotina TI, Kovalenko IV. Safety and quality of poultry products according to the HACCP system. *Visnyk Zhytomyr'skoho Natsional'noho Ahroekolohichnoho Universytetu*. 2012;2(1):24-34.
- [14] Kannan T. Age related ultrastructural changes in lymphoid organs of Nandanam layer chicken (*Gallus domesticus*). *J Entomol Zool Studies*. 2018;6(4):1417-21.
- [15] Kannan T, Ramesh G, Ushakumari S, Dhinakarraj G, Vairamuthu S. Age related changes in T cell subsets in thymus and spleen of layer chicken (*Gallus domesticus*). *Int J Current Microbiol Appl Sci*. 2017;6(1):15-9. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.601.002
- [16] Hu T, Wu Z, Vervelde L, Rothwell L, Hume D, Kaiser P. Functional annotation of the T-cell immunoglobulin mucin family in birds. *Immunology*. 2016;148(3):287-303. DOI: 10.1111/imm.12607
- [17] Peng X, Zhang K, Bai S, Ding X, Zeng Q, Yang J, et al. Histological lesions, cell cycle arrest, apoptosis and T cell subsets changes of spleen in chicken fed aflatoxin-contaminated corn. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(8):8567-80. DOI: 10.3390/ijerph110808567
- [18] Calefi A, Quinteiro-Filho W, Fukushima A, Cruz D, Siqueira A, Salvagni F, et al. Dexamethasone regulates macrophage and Cd4+Cd25+ cell numbers in the chicken spleen. *Rev Bras Cienc Avic*. 2016;18(1). DOI: 10.1590/18069061-2015-0035
- [19] Zhang Q, Waqas Y, Yang P, Sun X, Liu Y, Ahmed N, et al. Cytological study on the regulation of lymphocyte homing in the chicken spleen during LPS stimulation. *Oncotarget*. 2017;8(5). DOI: 10.18632/oncotarget.14502
- [20] Goralskii LP, Khomich VT, Kononskii OI. Fundamentals of histological technology and morphofunctional methods of research in norm and in pathology. *Zhitomir: Polissia*; 2011. 288 p.
- [21] Gorshkova EV, Kopylova SV, Kopylov AS, Zaitseva EV. Comparative macromorphology of spleen broiler chickens from the Smena-7 cross and Hisex Brown cross. *Vestnik Bryanskoy Gosudarstvennoy Sel'skokhozyaystvennoy Akademii*. 2014;2:27-30.
- [22] Turitsyna EG, Klimova YeA. Dynamics of age morphometric parameters of the organs of the quail's immune system. *Vestnik Krasnoyarskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta*. 2014;6:218-21.

- [23] Lapina TI, Tokarev OI. Pathohistologicheskoy picture of the thymus and spleen of chickens in viral hepatitis E. In: Proceedings of XVII Conf Modern Problems of Pathological Anatomy, Pathogenesis and Diagnosis of Animal Diseases; 2011; Moscow. p. 71-4.
- [24] Seleznev SB, Krotova YeA, Vetoshkina GA, Kulikov EV, Burykina LP. Basic principles of the structural organization of the immune system of quails Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzhby Narodov. Ser Agronomiya i Zhivotnovodstvo. 2015;4:68-76.
- [25] Stojanovskiy V, Garmata L, Kolomijets I. Functioning of the quail immune system at different periods of postnatal ontogenesis. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies Ser Veterinary Sciences. 2016;18(3):36-39. DOI: 10.15421/nvlvet7009
- [26] Gural'ska SV. Immunohistochemical characterization of lymphocyte subpopulations in the spleen of chickens after vaccination against infectious bronchitis. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies Ser Veterinary Sciences. 2016;18(3):62-6. DOI: 10.15421/nvlvet7014
- [27] Kannan T, Ramesh G. Light and electron microscopic details of blood-spleen barrier in nandanam chicken (*Gallus domesticus*). Int J Sci Res. 2015;4(6):2203-8.

О.Ф. Дунаевская

АНАТОМО-МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ СЕЛЕЗЕНКИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ *GALLUS GALLUS, FORMA DOMESTICA L., COLUMBIA LIVIA G., COTURNIX COTURNIX L.*

Проблематика. Селезенка как важный орган иммуногенеза чувствительна к изменениям внешней и внутренней среды. Это свойство используют в биомониторинге окружающей среды. Значение морфологических исследований селезенки возрастает в связи с заболеваниями птиц, возбудители которых представляют угрозу здоровью и жизни человека. Они необходимы для получения качественной и безопасной продукции птицеводства. Труды по морфометрическому изучению селезенки птиц носят фрагментарный характер. Поэтому актуальным является комплексное анатомическое, морфометрическое изучение селезенки птиц.

Цель. Установление основных морфометрических критериев селезенки птиц в норме: относительной массы, относительных площадей белой и красной пульпы, опорно-сократительного аппарата, иммунорегуляторного индекса.

Методика реализации. Анатомические исследования селезенки с определением топографии, линейных значений. Иммуногистохимические, гистологические и цитологические исследования микро- и ультрамикроскопических уровней после фиксации материала в формалине или глутаровом альдегиде. Окраску гистопрепаратов осуществляли гематоксилином Эрлиха и эозином и по методам Браше и Ван Гизона. Субпопуляции лимфоцитов выявляли с помощью мышиных моноклональных антител. Морфометрические определения относительной площади структурных компонентов селезенки и соотношений между ними у половозрелых голубя, курицы, перепела.

Результаты. Относительная масса селезенки равна $0,022 \pm 0,008$ % у голубя; $0,138 \pm 0,01$ % у курицы; $0,121 \pm 0,03$ % у перепела. Радиальные трабекулы в селезенке курицы отсутствуют, у голубя и перепела развиты слабо. Относительная площадь опорно-сократительного аппарата селезенки составляет $9,21 \pm 3,40$ % у голубя; $3,02 \pm 0,95$ % у курицы и $4,25 \pm 0,95$ % у перепела. Относительная площадь белой пульпы селезенки занимает $18,68 \pm 3,75$ % у курицы, $14,38 \pm 2,58$ % у перепела и $14,93 \pm 6,14$ % у голубя. Лимфоциты CD4+ и CD8+ локализовались преимущественно в периваскулярных лимфоидных влагищах. Лимфоциты CD19+ и CD20+ сконцентрированы в лимфоидных фолликулах, в пульпе доминировали CD20+-клетки. Ультрамикроскопической особенностью селезенки перепела является наличие больших ядрышек в клетках пульпы; у голубя по сравнению с другими птицами большее количество аутофагосом в лимфобластах; у курицы эндотелиальные клетки имеют хорошо развитые органеллы метаболического типа.

Выводы. Соотношение белой пульпы к красной равно 1:4,91 у голубя, 1:4,19 у курицы и 1:5,66 у перепела. Иммунорегуляторный индекс пульпы селезенки равен 2,00 у голубя; 1,85 у курицы; 1,73 у перепела. Полученные морфометрические критерии селезенки птиц в норме являются основанием для дальнейших исследований влияния факторов окружающей среды, микроорганизмов, фармакологических препаратов для разработки тест-системы органа в норме.

Ключевые слова: селезенка; голубь; курица; перепел; анатомия; морфометрия; ультраструктура; иммуногистохимия.

O.F. Dunaievska

ANATOMICAL AND MORPHOMETRIC CRITERIA OF SPLEEN IN MATURED *GALLUS GALLUS, FORMA DOMESTICA L., COLUMBIA LIVIA G., COTURNIX COTURNIX L.*

Background. The spleen, as an important organ of immunogenesis, is sensitive to changes in the external and internal environment. This property is used in environmental biomonitoring. The value of the morphological studies of the spleen increases with diseases of birds, the pathogens of which constitute a threat to human life and health. They are necessary for qualitative and safe poultry production. Proceedings on the morphometric study of the spleen of birds are fragmentary in nature. Therefore, the complex comprehensive anatomical, morphometric study of the spleen of birds is relevant.

Objective. The aim of the paper is to establish the morphometric criteria of the spleen of birds in the normal state: relative weight, relative areas of white and red pulp, musculoskeletal system, immunoregulatory index.

Methods. Anatomical examination of the spleen was realized with the definition of topography, linear values. Immunohistochemical, histological and cytological studies of micro- and ultramicroscopic level were carried out after fixation of material in formalin or glutaraldehyde. The coloring of histopreparations was carried out by Ehrlich's Hematoxylin and eosin; and by the methods of Brach and Van Gizon. Subpopulations of lymphocytes were detected using murine monoclonal antibodies. Morphometric determination of relative mass, the relative area of the structural components of the spleen (musculoskeletal system, white pulp, red pulp, lymphoid nodes) were detected in matured pigeon, chicken, quail.

Results. The relative spleen mass of a pigeon is $0.022 \pm 0.008\%$, chicken – $0.138 \pm 0.01\%$, quail – $0.121 \pm 0.03\%$. Radial trabeculae in a chicken spleen are absent, in the pigeon and quail are poorly developed. The relative area of the white pulp of a chicken spleen is $18.68 \pm 3.75\%$, quail – $14.38 \pm 2.58\%$, and pigeon – $14.93 \pm 6.14\%$. CD4+ and CD8+ lymphocytes were localized predominantly in lymphoid sheaths near the vessels. Lymphocytes CD19+ and CD20+ are concentrated in lymphoid nodes. CD20+ cells are dominated in the pulp. An ultramicroscopic singularity of the quail's spleen is large nucleolus in the pulp cells; pigeon, in comparison with other birds, got a greater number of autophagosomes in lymphoblasts; chicken endothelial cells have well-developed organelles of the metabolic type.

Conclusions. The ratio of white pulp to red in a pigeon was 1:4.91, chicken – 1:4.19, and quail – 1:5.66. The immunoregulatory pulp index was 2.00 in a pigeon; 1.85 in a chicken; 1.73 in a quail. The obtained morphometric criteria of the spleen of birds in the normal state provide the basis for further research on the influence of environmental factors, microorganisms, pharmacological preparations for the development of a test organ system in the normal state.

Keywords: spleen; pigeon; chicken; quail; anatomy; morphometry; ultrastructure; immunohistochemistry.