

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8346
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 619:615:619:612:636.8

Immunomorphologic transformation of the appendix of rabbits after antigenic loading using anti-pneumococcal prophylactic preparation «Pneumo-Pro»

Ya.V. Kisera, D.M. Levkivsky, Yu.G. Storchak

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

Article info

Received 23.01.2018
Received in revised form
28.02.2018
Accepted 09.03.2018

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.
Tel.: +38-097-722-65-56
E-mail: julietus1@gmail.com

Kisera, Ya.V., Levkivsky, D.M., & Storchak, Yu.G. (2018). Immunomorphologic transformation of the appendix of rabbits after antigenic loading using anti-pneumococcal prophylactic preparation «Pneumo-Pro». Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(83), 235–239. doi: 10.15421/nvlvet8346

Despite a widespread introduction of immunoprophylaxis, the national scientific literature doesn't frequently deal with the data containing a detailed description of the morphological state of the immune system's central and peripheral organs, as well as their immunomorphological rearrangement after the use of vaccines and the effects of immunostimulants. It is also worth noting that such organ of the peripheral immune system as a vermiform appendix was mainly ignored by the domestic scientists. The vermiform appendix is a lymphoepithelial organ that performs a protective function and relates to the peripheral part of the immune system. The development, proliferation and differentiation of immunocompetent cells occurs inside this important formation, first and foremost, of B-cell subpopulations. Vermiform appendix is sometimes called the tonsils of the abdominal cavity due to the high concentration of lymphoid cells in it. We did not find a detailed description of the morphological changes of the rabbits' vermiform appendix that occur after the introduction of immunobiological drugs. We conducted the histological studies of the vermiform appendix of rabbits after performing an antigenic stress using the vaccine against streptococcal and staphylococcal infections of animals along with the preventive agent «Pneumo-Pro» separately and combined with Selefer, a selenium-containing immunostimulant. Histological studies of the rabbits' vermiform appendix performed after the parenteral introduction of immunoprophylactic drugs revealed significant structural changes in the lymphoid apparatus: there is a significant amount of lymphoblasts in the center of submucosal lymphoid nodes; mitosis of lymphocytes is often visualized; large, medium and small lymphocytes as well as macrophages locate in the dome of submucosal lymphoid nodes; there are numerous volumetric clusters of lymphoid tissue that form submucosal clusters of lymphoid nodes in the plate and submucosal basis of the appendix; the peripheral part of the lymphoid nodes and the interfollicular area contain a significant number of T-lymphocytes; the vast majority of secondary lymphoid follicles are cone-shaped; appendix crypts contain a large number of exocrinocytes.

Key words: rabbits, aphid, prophylactic preparation «Pneumo-Pro», lymphoid nodes, crypts, lymphocytes, B-lymphoblasts, macrophages, epithelial cells, plasm- and exocrinocytes.

Імуноморфологічна перебудова червоподібного відростка кролів після антигенного навантаження з використанням протипневмококового профілактичного препарату «Пневмо-Про»

Я.В. Кісера, Д.М. Левківський, Ю.Г. Сторчак

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,
м. Львів, Україна

Імуноморфологічна перебудова центральних і периферичних органів імунної системи після застосування засобів специфічної профілактики потребує детального опису змін, які проходять в них. Варто вказати і на те, що такий орган периферичної імунної системи, як червоподібний відросток в основному залишався без уваги вітчизняних вчених. В доступній літературі не знайдено детального опису морфологічних змін червоподібного відростка у кролів, які виникають після введення імунобіологічних препара-

тів. Проведені гістологічні дослідження червоподібного відростка кролів після антигенного навантаження тварин, з використанням профілактичного препарату «Пневмо-Про». Встановлені структурні зміни у лімфоїдному апараті, а також у структурних елементах слизової оболонки, підслизової основи. Зокрема, розвивається виражена гіперплазія лімфоїдних елементів. Відзначена інфільтрація підслизової основи органа плазматичними клітинами. Спостерігається збільшення кількості екзокриноцитів.

Ключові слова: кролі, червоподібний відросток, профілактичний препарат «Пневмо-Про», лімфоїдні вузлики, крипти, лімфоцити, В-лімфобласти, макрофаги, епітеліоцити, плазмо- та екзокриноцити.

Вступ

Червоподібний відросток (апендикс) – лімфоепітеліальний орган, який виконує захисну функцію і відноситься до периферійної ланки імунної системи. Це важливе утворення, в якому відбувається розвиток, проліферація та диференціація імунокомпетентних клітин, насамперед – В-клітинних субпопуляцій. (Dasso et al., 2000). У зв'язку з високою насиченістю лімфоїдними елементами його іноді називають мигдалинами черевної порожнини.

Червоподібний відросток входить до складу лімфоїдних утворень та вважається серед ссавців найбільш вірогідним аналогом фабрицієвої сумки у птахів (Bahmet, 2008; Bibik and Berest, 2011; Vorob'eva, 2017).

Якщо вважати апендикс аналогом первинного лімфоїдного органу для В-лімфоцитів, то в ньому є особливість, яка відрізняє його від первинного Т-органу, тимуса. У тимус не проникають антигени, а в апендиксі є масивна порція мікробного антигену, який поглинають макрофаги лімфоїдної тканини, спочатку міжфолікулярні, а потім внутріфолікулярні. Схожість із тимусом полягає або у повній відсутності, або в дуже малій кількості плазматичних клітин, розташованих у лімфоїдній тканині апендикса (Kooij et al., 2016). Особливо велика кількість внутріфолікулярних клітин міститься в лімфоїдних фолікулах апендикса кроля (Ljubovceva et al., 2009).

У слизовому шарі апендикса зосереджено приблизно 30% усіх імунокомпетентних клітин кишечника; близько 25% слизового шару складається з імунологічно активної тканини (Galeeva, 2012; Kostilenko and Grin', 2012).

Лімфоїдна тканина червоподібного відростка – це свого роду бар'єрна зона під час проникнення чужорідних агентів через слизову оболонку. Для лімфоїдних скупчень апендикса характерна розпізнавальна функція, яка полягає в тому, що антигени взаємодіють з клітинами імунної системи, в подальшому інформація надходить в тимус та кістковий мозок (Murphy et al., 2011; Kuz'mina et al., 2014).

Особливості функціонування лімфоїдної тканини, асоційованої з кишечником, полягають у тому, що інтактні лімфоцити проникають у кровеносну систему, далі проходять у червоподібний відросток, де розвивається процес праймінгу: під впливом особливого цитокінового оточення В-лімфоцити диференціюються в клітини, детерміновані до синтезу sIg A. Такі лімфоцити аферентними лімфатичними протоками проникають до мезентеріальних лімфатичних вузлів, током крові у селезінку, де здійснюється диференціація В-лімфоцитів. Потім вони проникають до органів, які містять слизову оболонку, наприклад у слизову оболонку тонкого і товстого відділу кишеч-

ника, де інтенсивно розмножуються (Gorfu et al., 2009; Kooij et al., 2016).

Як доказ існування імунної активності лімфоїдної тканини апендикса у відповідь на введення кролям антигенів у просвіт органа або його стінку спостерігається підвищення розеткоутворюючих властивостей лімфоцитів органа. Імунізація кролів веде до збільшення в лімфоїдній тканині апендикса числа молодих і диференційованих В-лімфоцитів. В умовах антигенної стимуляції лімфоїдні вузлики червоподібного відростка виконують роль периферичних органів імунної системи (Dasso et al., 2000; Junqueira and Carneiro, 2005; Velazquez et al., 2005; Hanson and Lanning, 2008).

Участь апендикса в імунній системі доводиться ще й тим аспектом, що наявність в лімфоцитах апендикса реакції на лужну фосфатазу та відсутність реакції на кислу фосфатазу дозволило зробити висновок про його переважну приналежність до В-залежної частини імунної системи. (Smirnova et al., 2009; Gusejnov and Gusejnova, 2012; Petrenko, 2013).

Зважаючи на те, що упродовж багатьох років апендикс залишався поза увагою, перед нами було поставлено мету вивчити імуноморфологічні перебудови у червоподібному відростку кролів після антигенного навантаження з використанням протипневмококового профілактичного препарату «Пневмо-Про».

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводились на кафедрах епізоотології, нормальної та патологічної морфології і судової ветеринарії Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Для досліду за принципом аналогів було підбрано 8 кролів двомісячного віку, з яких було сформовано 2 групи (1 контрольна і 1 дослідна). Тваринам дослідної групи вводили профілактичний препарат «Пневмо-Про» внутрішньом'язово двічі з інтервалом 14 днів у дозі 0,5 см³ при першому та 1 см³ при другому введенні (Storchak and Kisera, 2015). Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин. Тварин забивали на 45-й день.

Розтин тварин проводили за методом Шора (Goral's'kij, 2005). Для гістологічних досліджень відбирали шматочки червоподібного відростку відразу після забою тварин та фіксували в 10-12% охолодженому розчині нейтрального формаліну з подальшим заливанням у парафін за схемою, запропонованою Дж. Кумаром та Л. Рудбеком (Kumar and Rudbeck, 2011). Для виявлення морфології клітин і тканин застосовували фарбування гематоксиліном Караці та еозином, а також метиленовим-зеленим та піроніном G за Браше (Merkulov, 1996; Kjunel', 2007).

Результати та їх обговорення

За результатами проведених гістологічних досліджень встановлено, що слизова оболонка червоподібного відростка контрольної групи тварин вкрита добре помітними неглибокими криптами, які простягаються у напрямку підслизової основи. Просвіт одних крипт помірно широкий, інших – звужений. Крипти не містять стороннього вмісту, вистелені одношаровим призматичним епітелієм, у складі якого переважають стовпчасті епітеліоцити, також наявні келихоподібні клітини, М-клітини та ентероендокриноцити. На дні кишкових крипт досить часто зустрічаються клітини Панета, які у цитоплазмі містять ацидофільні гранули. У зазначеній зоні також розташовуються недиференційовані (камбіальні) епітеліоцити та ендокринні клітини.

Власна пластинка слизової оболонки без різкої межі переходить в підслизову основу. Лімфоїдні фолікули майже повністю заповнюють проміжки між криптами та займають значний об'єм підслизової основи (рис. 1).

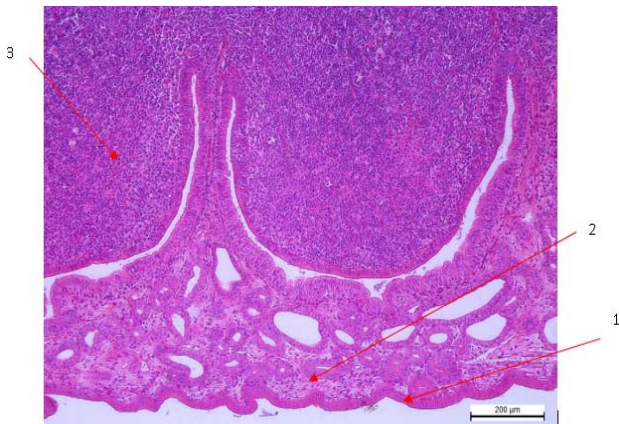


Рис. 1. Слизова оболонка (1) та підслизова основа (2) червоподібного відростка контрольної групи кролів. Лімфоїдні вузлики (3) щільно заповнені клітинними елементами. Гематоксилін-еозин x100

Переважає більшість лімфоїдних фолікулів конусовидної форми. Деякі лімфоїдні вузлики із куполоподібною верхівкою контактують з просвітом кишки (рис. 2).

Клітинний склад підслизових скупчених лімфоїдних вузликів гетерогенний. Деяко по периферії наявна помірна кількість В-лімфоцитів. Міжфолікулярні зони переважно заповнені Т-лімфоцитами. Судини слизової оболонки та підслизової основи помірно розширені.

За гістологічного дослідження червоподібного відростка кролів дослідної групи на 45 добу після введення профілактичного засобу «Пневмо-Про» виявлено, що слизова оболонка вкрита добре помітними неглибокими криптами, які простягаються у напрямку підслизової основи (рис. 3).

У власній пластинці та в підслизовій основі розташовуються об'ємні скупчення лімфоїдної тканини, які формують підслизові скупчені лімфоїдні вузлики, центр яких утворений проліферуючими лімфобластами.

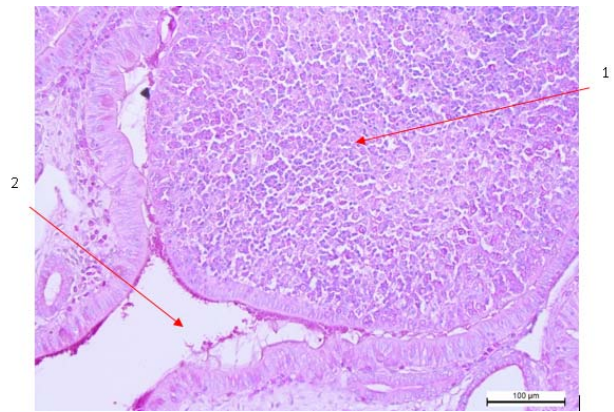


Рис. 2. Лімфоїдний вузлик (1) червоподібного відростка контрольної групи кролів, що контактує із просвітом кишки (2). Значна кількість клітинних елементів у лімфоїдному вузлику Метиленовий-зелений та піронін G за Браше x 200

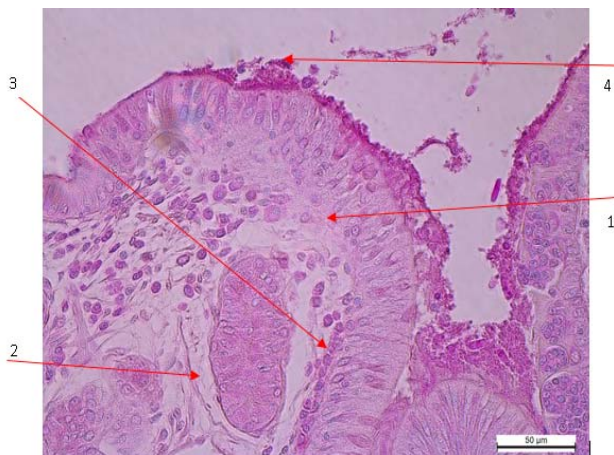


Рис. 3. Інфільтрація пухкої сполучної тканини слизової оболонки (1) та підслизової основи (2) червоподібного відростка дослідної групи кролів плазматичними клітинами (3). Збільшення кількості слизу (4) на поверхні слизової оболонки. Метиленовий-зелений та піронін G за Браше x 400

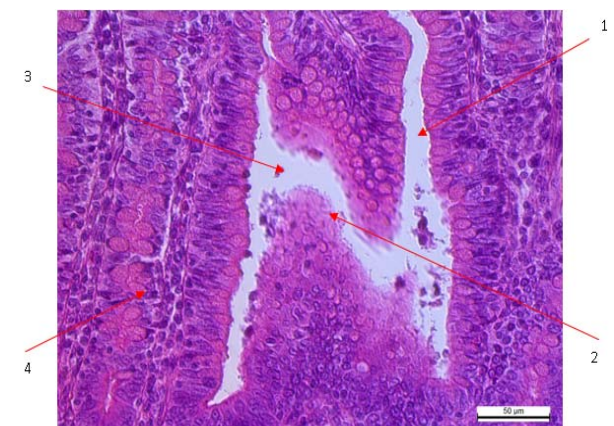


Рис. 4. Збільшення кількості екзокриноцитів у криптах (1) червоподібного відростка дослідної групи кролів. Десквамація епітеліоцитів (2) у просвіт крипт (3). Інфільтрація власної пластинки слизової оболонки лімфоцитами (4). Гематоксилін-еозин x 200

По периферії від лімфобластів розташовуються В-лімфоцити, макрофаги та інтердигітуючі клітини. Подекуди лімфоцити зазнають некротичних змін, унаслідок чого між лімфоїдними елементами наявні невеликі проміжки (рис. 4).

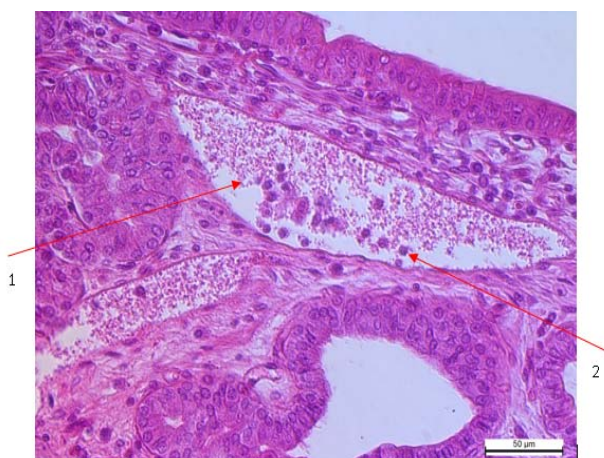


Рис. 5. Розширення судин (1) слизової оболонки червоподібного відростка дослідної групи кролів. Лімфоцити (2) та гемолізовані еритроцити у просвіті судин. Гематоксилін-еозин х 400

Судини слизової оболонки та підслизової основи розширені, переповнені еритроцитами, подекуди містять лімфоцити. Подекуди реєструються склеювання та гемоліз еритроцитів (рис. 5). Також спостерігаються помірно виражені периваскулярні набряки.

Висновки

Після введення профілактичного препарату «Пне-вмо-Про» у тварин дослідної групи відмічені структурні зміни у лімфоїдному апараті, а також у структурних елементах слизової оболонки, підслизової основи:

- 1) у центрі підслизових лімфоїдних вузликів міститься значна кількість лімфобластів, досить часто візуалізуються мітози лімфоцитів;
- 2) у куполі підслизових лімфоїдних вузликів розташовуються лімфоцити різних ступенів зрілості, макрофаги;
- 3) у власній пластинці та в підслизовій основі апендикса містяться численні, об'ємні скупчення лімфоїдної тканини, які формують скупчення вторинних лімфоїдних вузликів;
- 4) у складі крипт апендиксу є значна кількість екзокриноцитів.

References

Bahmet, A.A. (2008). Vlijanie nekotoryh immunopeptidov na immunnye struktury limfoidnyh bljashek tonkoj kishki (jeksperimental'noe issledovanie) [The effect of some immunopeptides on the immune structures of small intestinal lymphoid plaques]. *Rossijskij zhurnal Gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 18(5), 38–44 (in Russian).

Bibik, E.Ju., & Berest, A.Ju. (2011). Sovremennye predstavlenija o morfogeneze pervichnogo limfoidnogo

organa [Modern ideas about the morphogenesis of the primary lymphoid organ]. *Ukrainskij morfologicheskij al'manah*. 9(3), 43–46 (in Russian).

Dasso, J.F., Obiakor, H., Bach, H., Anderson, A.O., & Mage, R.G. (2000). A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Developmental and Comparative Immunology* 24(8), 797–814. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906392>.

Galeeva, Je.N. (2012). Sovremennye predstavlenija o plodnoj anatomii organov limfoidnoj sistemy čeloveka (obzor literatury) [Modern ideas about the fetal anatomy of the organs of the human lymphoid system (review)]. *Vestnik novyh medicinskih tehnologij*. 19(2), 384–400 (in Russian).

Goral's'kij, L.P. (2005). Osnovi gistologičnoji tehniki i morfofunkcional'ni metodi doslidzhennja u normi ta pri patologiji: navch. Posibnik [Fundamentals of histological technology and morphofunctional methods of research in normal and in pathology: teaching. Manual]; Derzhavnij agroekologičnij un-t. Zhitomir: Polissja (in Ukrainian).

Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., & Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med*. 9(7), 836–50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860663>.

Gusejnov, T.S., & Gusejnova, S.T. (2012). Diskusijnyj vopros anatomii pejerovyh bljashek tonkoj kishki [Discussion of the anatomy of Peyer's small intestine plaques]. *Saratovskij nauchno-medicevskij zhurnal*. 8(3), 687–691 (in Russian).

Hanson, N.B., & Lanning, D.K. (2008). Microbial induction of B and T cell areas in rabbit appendix. *Developmental and Comparative Immunology*. 32(8), 980–991. doi: 10.1016/j.dci.2008.01.013.

Junqueira, L., & Carneiro, J. (2005). Basic histology: text and atlas, 11th edn. New York: McGraw-Hill Medical.

Kjunel', V. (2007). Cvetnoj atlas po citologii, gistologii i mikroskopicheskoj anatomii [Color atlas on cytology, histology and microscopic anatomy]. Per. s angl. E Pogosjan. M.: AST: Astrel' (in Russian).

Kooij, A., Sahami, S., Meijer, S.L., Buskens, C.J., & te Velde, A.A.. 2016. The immunology of the vermiform appendix: a review of the literature. *Clin Exp Immunol*. 186(1), 1–9. doi: 10.1111/cei.12821.

Kostilenko, Ju.P., & Grin', V.G. (2012). Strukturno-funkcional'naja harakteristika červeobraznogo otrostka ljudej v vozrastnom aspekte [Structural and functional characteristics of the appendix in the age aspect]. *Mir mediciny i biologii*. 8(2), 103–106 (in Russian).

Kumar, G.L., & Rudbeck, L. (2011). Immunogistohimicheskie metody: Rukovodstvo [Immunohistochemical methods: Manual]: Per. s angl. pod red. G.A. Franka i P.G. Mal'kova. M. <http://www.forens-med.ru/book.php?id=1705> (in Russian).

Kuz'mina, L.A., Parovichnikova, E.N., Mendeleeva, L.P., & Pokrovskaja, O.S. (2014). Transplantacija allogennogo kostnogo mozga pri hroničeskom mielolejkoze [Allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia]. *Gematologija i transfuziologija*. 59, 49 (in Russian).

- Ljubovceva, L.A., Efremova, O.A., Golubcova, N.N., & Russov, A.V. (2009). Svojstva granuljarnyh ljuminescirujushhih kletok [Properties of granular luminescent cells]. *International Journal on Immunorehabilitation*. 11(1), 25a–26 (in Russian).
- Merkulov, G.A. (1996). Kurs patologoanatomicheskoy tehniki [Course of pathoanatomical techniques]. Izd-vo «Medicina», Leningradskoe otdelenie. (in Russian).
- Murphy, K., Travers, P., Janeway, C., & Walport, M. (2011). *Janeway's immunobiology*, 7th edn. New York: Garland Science.
- Petrenko, V.M. (2013). Funkcional'naja anatomija limfaticheskoj sistemy: sovremennye predstavlenija i napravlenija issledovanij [Functional anatomy of the lymphatic system: modern views and directions of research]. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij*. 12, 94–97 (in Russian).
- Smirnova, T.L., Sapozhnikov, S.P., Sergeeva, V.E., & D'jachkova, I.M. (2009). Nejromediatornoe obespechenie limfoidnyh i nelimfoidnyh organov v uslovijah jeksperimental'noj nejromoduljacii [Neurotransmitter supply of lymphoid and non-lymphoid organs under experimental neuromodulation]. *Allergologija i immunologija*. 10(1), 32–33 (in Russian).
- Storchak, Ju.G., & Kiser, Ja.V. (2015). Patent Ukrayini na korisnu model' № 99019. Profilaktichnij zasib dlja borot'bi iz pnevmokokovuju infekciju teljat [Prophylactic agent for fighting pneumococcal infection of calves]. № u201413768; Bjul. № 9. <http://uapatents.com/7-99019-profilaktichnijj-zasib-dlya-borotbi-iz-pnevkokokovoyu-infekciehyutelyat.html> (in Ukrainian).
- Velazquez, P. Wei, B., & Braun, J. (2005). Surveillance V lymphocytes and mucosal immunoregulation. *Springer Seminars in Immunopathology*. 26(4), 453–462. <https://escholarship.org/uc/item/98r69907>.
- Vorob'eva, N.F. (2017). Patomorfologicheskoe i immunogistohimicheskoe issledovanie struktur appendiksa posle allogenoj peresadki kostnogo mozga [Pathomorphological and immunohistochemical examination of appendix structures after bone marrow transplantation]. Izdatel'sko-poligraficheskij centr «Nauchnaja kniga», Voronezh (in Russian).