



УДК 619:616–07:636.028:611.34

А.П. АКУЛОВА, аспирант,
Н.П. КАЗАРИНОВ, кандидат медицинских наук, заведующий сектором,
Н.А. ДОНЧЕНКО, доктор ветеринарных наук, директор

Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
630501, Новосибирская область, пос. Краснообск
e-mail: anak04@yandex.ru

ВЫЯВЛЕНИЕ ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШЕК МЫШЕЙ ПУТЕМ ЗАПОЛНЕНИЯ КИШЕЧНИКА КОНТРАСТНОЙ МАССОЙ

В Институте экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Новосибирская область, пос. Краснообск) разработан способ выявления сгруппированных лимфоидных узелков (пейеровых бляшек) тонкого кишечника мышей путем его заполнения контрастной массой. В качестве контраста использован водный раствор черной туши. Показано, что на ее фоне пейеровы бляшки хорошо видны, при этом их контуры становятся более четкими. Для контрастирования бляшек мышам массой 20–22 г внутрижелудочно вводили 1,2 мл туши за 75 мин до убоя. При этом за сутки до этого кормление животных прекращали, доступ к воде не ограничивали. Установлено, что при заполнении кишечника тушью за счет перистальтических движений (в отличие от его заполнения под давлением у мертвых мышей) не происходит перерастяжения стенок кишки и искажения размеров сгруппированных узелков. Для обеспечения равномерного распределения туши в кишечнике к ней добавляли 0,01 мг атропина сульфата. Применение спазмолитика позволило заполнить тонкую кишку контрастной массой без пустых промежутков, что необходимо для контрастирования всех пейеровых бляшек. Показано, что введение туши и атропина в указанных количествах не оказывает негативного воздействия на общее состояние и поведение животных. Заметного влияния атропина на размеры бляшек не выявлено. Проведено сравнение результатов подсчета и измерений бляшек в группах с контрастированием и без него. Установлено, что предложенный метод позволяет увеличить количество выявляемых бляшек на 45 %, показатель средней площади бляшки при этом возрастает на 21 % ($p < 0,05$). Проведено гистологическое исследование тонкого кишечника после выполнения контрастирования. Не выявлено какого-либо негативного влияния на микроскопическую структуру слизистой оболочки, включая столбчатые эпителиоциты вершин ворсин и их щеточную каемку. Сажа, входящая в состав туши, не препятствовала изготовлению гистологических срезов.

Ключевые слова: мыши, сгруппированные лимфоидные узелки, сгруппированные лимфоидные фолликулы, пейеровы бляшки, контрастирование, морфометрия.

Сгруппированные лимфоидные узелки, или пейеровы бляшки, играют существенную роль в иммунных реакциях кишечника и всего организма [1, 2]. При различных патологических процессах и экспериментальных воздействиях в них возникают морфологические изменения, которые отражают состояние иммунной системы и привлекают внимание большого числа исследователей [3–6]. Обычно при изучении лимфоидных образований кишечника оценивают их функциональное состояние, о котором судят по изменениям размеров лимфоидных узелков и появлению или исчезновению в них реактивных центров. Эти изменения отражаются на

размерах сгруппированных узелков и могут быть зафиксированы визуально. Как правило, в таких исследованиях используют лабораторных крыс и более крупных животных. Морфометрию пейеровых бляшек мышей проводят крайне редко из-за мелких размеров этих структур, сложности их выявления и прицельного изготовления гистологических срезов.

Существует способ выявления лимфоидных образований тонкой кишки, предложенный С.А. Кащенко и Е.Н. Морозовой, в ходе которого кишечник вскрывают, промывают, окрашивают слизистую оболочку, погружают препарат в воду, где проводят измерения [7]. Данный метод используют для выявления пейеровых бляшек крыс. Подобные манипуляции с кишечником мышей выполнить намного сложнее из-за его мелких размеров. Нами проведены исследования моделей заболеваний на лабораторных мышах, в ходе которых требовалось оценить количественно изменения лимфоидных структур кишечника и выявить их микроскопические особенности.

Цель исследования – разработать метод контрастирования пейеровых бляшек мышей, не вызывающий значительных повреждений кишечника.

Задачи исследования – разработать способ заполнения кишки контрастом, не сопровождающийся ее вскрытием и перерастяжением; обеспечить равномерное распределение контрастной массы в тонком кишечнике по всей его длине; оценить эффективность выявления пейеровых бляшек при использовании контрастирования; оценить пригодность кишки для дальнейших гистологических исследований после введения туши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в секторе патоморфологии Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока. Исследование проведено на нелинейных мышах – самцах массой 20–22 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария, все манипуляции проводили в соответствии с требованиями гуманного обращения с животными [8]. Использовали две группы по 10 животных: контрольную и опытную. За сутки до убоя кормление прекращали. Доступ к воде не ограничивали. Мышам опытной группы внутрижелудочно тонким гибким зондом вводили контрастное вещество (черную тушь на водной основе) в объеме 1,2 мл с 0,01 мг атропина сульфата. Через 75 мин после введения туши животных убивали, кишечник выделяли и раскладывали на ровной поверхности, затем подсчитывали количество бляшек и проводили их измерения. Животных контрольной группы изучали схожим образом, но без введения туши. Исследование проводили в условиях хорошего естественного освещения без использования увеличительных приспособлений. Бляшки измеряли со стороны серозной оболочки линейкой с миллиметровыми делениями, прикладывая ее рядом с бляшкой. Кишечник при этом не вскрывали. Измеряли длину и ширину бляшек, затем высчитывали их площадь по формуле площади эллипса

$$S = \pi ab,$$

где a – длина большой полуоси; b – длина малой полуоси. После подсчета и измерений вырезали участки тонкой кишки для гистологических иссле-

дований. Длина вырезанных участков составляла около 0,5 см. Изучали образцы двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок. Материал фиксировали в 10%-м растворе формалина, выполняли заливку в парафин по стандартным методикам. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином и изучали под микроскопом. Нормальность распределения количественных данных проверяли путем построения гистограмм. Вычисляли среднее значение M , ошибку среднего значения m . Достоверность различий определяли по t -критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Способ введения туши (внутрижелудочно живым мышам) был выбран из-за того, что при заполнении кишечника мертвых мышей под давлением он сильно растягивается, искажая размеры бляшек. Могли происходить разрывы патологически измененных участков. В ходе исследования подобрано оптимальное количество туши для введения мышам массой 20–22 г. Установлено, что 1,2 мл туши полностью заполняет тонкий кишечник. Введение такого объема на голодный желудок, видимо, не причиняет мышам значительных неудобств, поскольку сразу после манипуляции они ведут себя обычным образом, могут есть предложенный им корм.

Для обеспечения равномерного заполнения кишечника по всей длине потребовалось снижение тонуса гладкой мускулатуры. Был использован атропина сульфат в минимальной дозе, дающей эффект. На рис. 1 показано, что применение атропина позволяет равномерно заполнить тонкий кишечник контрастом без пустых промежутков.

Применение туши позволило сделать бляшки более заметными, а их контуры более четкими. На рис. 2, *а* изображен участок кишки, не заполненный тушью. Пейерова бляшка едва различима, несмотря на увеличе-

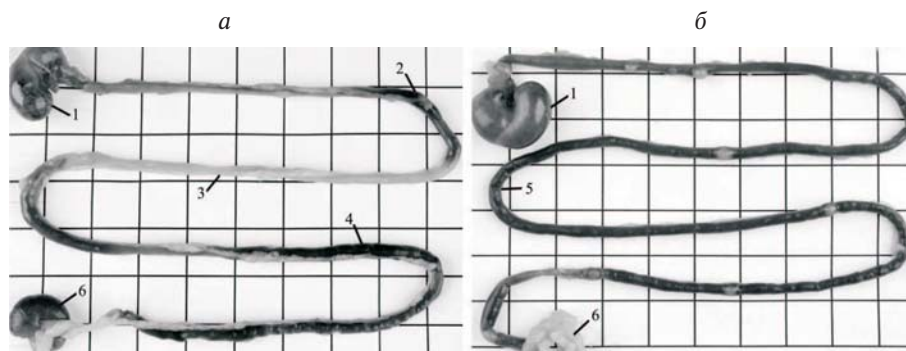


Рис. 1. Желудок и кишечник через 75 мин после введения туши:

а – без атропина; *б* – с атропином. Темные участки органов содержат тушь:

1 – желудок; 2 – участки двенадцатиперстной и тощей кишок, заполненные тушью; 3 – участок тощей кишки, не заполненный тушью (длиной около 9 см); 4 – участок тонкой кишки, заполненный тушью; 5 – тонкий кишечник, равномерно заполненный тушью по всей длине; 6 – слепая кишка.

Расстояние между линиями 1 см

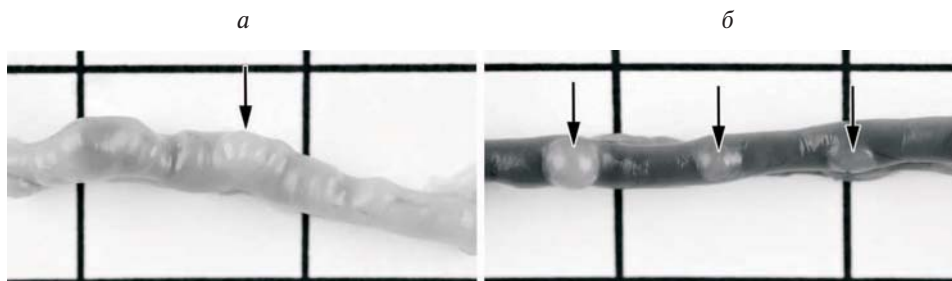


Рис. 2. Фрагменты тонкой кишки:

а – без туши; б – с тушью.

Стрелками указаны пейеровы бляшки. Расстояние между линиями 1 см

ние. При этом соседние с ней участки кишки имеют схожий рельеф и цвет. На рис. 2, б показан участок кишки после контрастирования. Бляшки хорошо видны. Сложность выявления их зависит от условий эксперимента. В некоторых ситуациях (обычно у здоровых животных) бляшки хорошо видны без контрастирования. Однако иногда они не отличаются от окружающих участков кишки ни цветом, ни рельефом. Затрудняют выявление бляшек скопление в кишечнике желчи и пузырьков газов, утомление зрения исследователя и другие факторы. В этих случаях контрастирование является полезным.

Для оценки эффективности метода проведено сравнение результатов подсчета и измерения бляшек в двух ситуациях: без контрастирования и с контрастированием. Подсчет и измерения осуществлены в схожих условиях. В проведенном эксперименте контрастирование позволило выявить на 45 % бляшек больше ($p < 0,05$). Средняя площадь бляшки при этом оказалась выше на 21 % ($p < 0,05$) (см. таблицу). Кроме того, в опытной группе измерения выполнены быстрее и с меньшим утомлением зрения.

Нами изучена пригодность кишки после контрастирования для дальнейших гистологических исследований. Основное внимание уделено наиболее уязвимым структурам слизистой оболочки: столбчатым эпителиоцитам вершин ворсин и их исчерченной каемке [9]. В ходе микроскопических исследований патологических изменений в данных структурах не найдено (рис. 3). Сажа, входящая в состав туши, не препятствовала изготовлению срезов.

Важным условием получения препаратов хорошего качества является быстрое помещение органа в фиксатор после убоя [10]. При наличии определенных навыков все измерения можно выполнить до развития заметных

Таблица 1

Результаты подсчета числа и площади пейеровых бляшек ($M \pm m$)

Показатель	Группа		Увеличение показателя, %
	контрольная	опытная	
Число бляшек у животного	$6,5 \pm 0,5$	$9,4 \pm 0,7^*$	45
Площадь бляшки, мм ²	$2,8 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,2^*$	21

* $p < 0,05$.

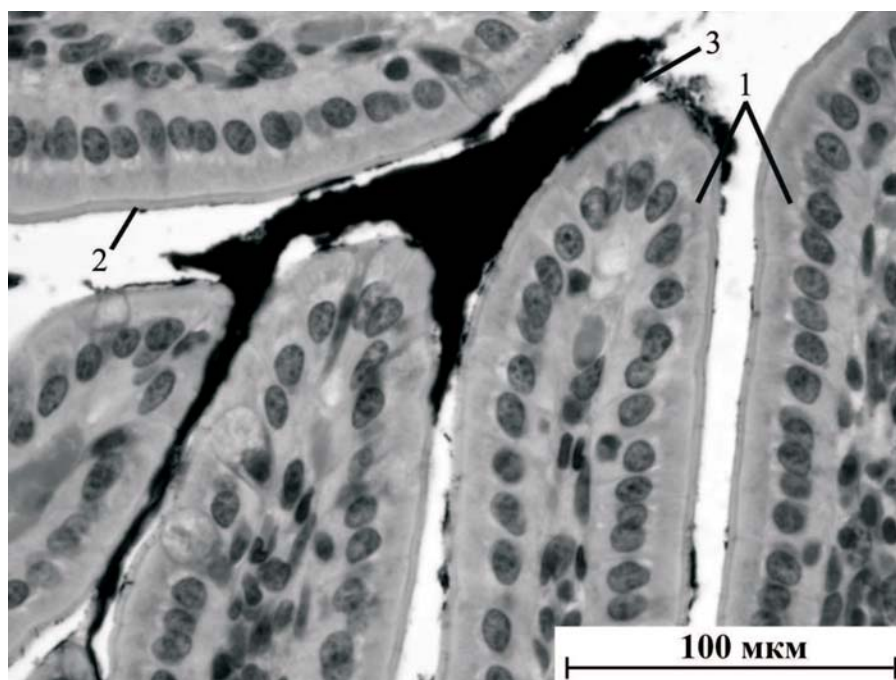


Рис. 3. Микропрепарат тощей кишки после введения туши:

- 1 – столбчатые эпителиоциты ворсин; 2 – щеточная каемка столбчатых эпителиоцитов;
3 – тушь в просвете кишки между ворсинами.
Окраска гематоксилином и эозином

посмертных изменений. Значительно сократить промежуток времени от убоя до помещения органа в фиксатор можно при использовании фотографии для подсчета бляшек и их измерений, например, как на рис. 1, б.

ВЫВОДЫ

1. Применение предложенного метода контрастирования пейеровых бляшек у мышей позволяет увеличить число выявляемых бляшек и показатели их площади.

2. Описанный метод выявления пейеровых бляшек не препятствует проведению дальнейших гистологических исследований.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Конорев М.Р., Коневалова Н.Ю.** Современные представления об иммунной системе, ассоциированной со слизистыми оболочками кишечника // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 2. – С. 40–46.
2. **Хаитов Р.М., Пинегин Б.В.** Особенности организации и функционирования иммунной системы желудочно-кишечного тракта и заболевания, связанные с нарушениями ее функционирования // Анналы хирургической гепатологии. – 1998. – Т. 3, № 1. – С. 112–116.
3. **Григоренко Д.Е., Васянина К.А.** Реакция лимфоидной ткани в стенке 12-перстной кишки и лимфоидной бляшки у крыс при моделировании гипокинезии // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2013. – № 4. – С. 402–406.
4. **Гусейнов Т.С., Гусейнова С.Т.** Дискуссионные вопросы анатомии пейеровых бляшек тонкой кишки // Саратовский науч.-мед. журн. – 2012. – Т. 8, № 3. – С. 687–691.

5. Кочергин И.А., Марьяновская Ю.В. Влияние локальной абдоминальной декомпрессии на микроархитектонику лимфоидной ткани, ассоциированной с желудком и кишечником, и стимуляцию абдоминального иммунного ответа // Вестн. Новгородского гос. ун-та им. Ярослава Мудрого. – 2014. – № 76. – С. 9–12.
6. Бгатов Н.П., Голохваст К.С., Бгатов А.В. и др. Модулирующее действие природного цеолита на структуру пейеровых бляшек в условиях накопления цезия // Тихоокеанский мед. журн. – 2009. – № 3. – С. 74–77.
7. Кашенко С.А., Морозова Е.Н. Выявление морфологических особенностей лимфоидных образований тонкой кишки при окраске нативного препарата // Мир медицины и биологии. – 2011. – Т. 7, № 1. – С. 27–29.
8. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль–2С, 2010. – 358 с.
9. Коняева Т.П., Долгих В.Т., Еломенко С.Н. Функционально-морфологические изменения тонкой кишки в раннем постреанимационном периоде // Бюл. сибирской мед. – 2004. – № 2. – С. 5–13.
10. Хонин Г.А., Барашкова С.А., Семченко В.В. Морфологические методы исследования в ветеринарной медицине. – Омск: Омская областная типография, 2004. – 198 с.

Поступила в редакцию 05.06.2015

A.P. AKULOVA, Postgraduate,
N.P. KAZARINOV, Candidate of Science in Medicine, Sector Head,
N.A. DONCHENKO, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Director

Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East

Krasnoobsk, Novosibirsk District, Novosibirsk Region, 630501

e-mail: anak04@yandex.ru

IDENTIFICATION OF PEYER'S PATCHES IN MICE BY FILLING THEIR INTESTINE WITH CONTRAST MASS

At the Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East (Krasnoobsk, Novosibirsk Region) was developed a method for identifying grouped lymphoid nodules (Peyer's patches) in the small intestine of mice by filling it with the contrast mass. It is shown that the Peyer's patches are well seen against its background, with their contours outlined more sharply. For contrasting the patches, 1.2 ml of ink was intragastrically injected to the mice weighing 20–22 g 75 minutes before slaughtering. With that, one day before using the method the feeding of animals was stopped, the access to water being not limited. It has been established that when the intestine is filled with ink due to the peristaltic movements (in contrast to its filling under pressure in slaughtered mice), the distension of the intestine wall and distortion of the grouped nodule size don't occur. The dose of 0.01 mg of atropine sulfate was added to ink to ensure the uniform ink distribution in the intestine. The use of the antispasmodic agent allowed filling the small intestine with the contrast mass without empty spaces that is necessary for contrasting all the Peyer's patches. It is shown that the injection of ink and atropine in the mentioned doses doesn't exert negative influence on the general condition and behavior of the animals. The noticeable effect of atropine on the patch size wasn't detected. The comparison of the results from counting and measuring the patches in the groups with contrasting and without it was made. It has been found that the proposed method allows increasing the number of the patches detected by 45%, thus the index of the average area of the patch increases by 21% ($p < 0.05$). The histological examination of the small intestine was carried out after contrasting. Any negative impact on the microscopic structure of the intestinal mucosa including the columnar epithelial cells of apexes of the villi and their striated border wasn't revealed. The soot, which is a part of ink, didn't interfere with the production of the histological sections.

Keywords: mice, grouped lymphoid nodules, grouped lymphoid follicles, Peyer's patches, contrasting, morphometry.