

Оценка возраст-зависимых гистопатологических изменений, происходящих в слезной железе стареющих крыс Wistar



Ю.П. Новикова



Э.Н. Григорян

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН
ул. Вавилова, 26, Москва, 119334, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2024;21(1):205-213

Цель исследования. Крысы Wistar часто используются в офтальмологических исследованиях и при тестировании веществ, обладающих терапевтическим действием. Состояние глаз этих животных, как и других млекопитающих и человека, в норме, при патологии и старении зависит от работы слезных желез. Целью данного исследования была разработка удобных подходов для определения возрастзависимых гистопатологических изменений в эксорбитальных слезных железах стареющих крыс.

Материал и методы. Материалом исследования служили изолированные эксорбитальные слезные железы (ЭСЖ), полученные от крыс Wistar в возрасте 8 и 11 мес. Изменения в структуре ЭСЖ были оценены с помощью методов компьютерной обработки морфологических картин и количественной обработки данных. **Результаты.** Отражением функционирования и состояния ЭСЖ являются ее структурные изменения и прогрессирующее воспаление. В работе предложен простой способ оценки состояния ЭСЖ у стареющих крыс с использованием методов морфологии и компьютерных программ. С помощью предложенного подхода показано, что в период с 8 до 11 мес. постнатального развития у крыс Wistar происходят существенные возрастзависимые изменения. Они проявляются в прогрессе дистрофии паренхимы и прогрессирующей инфильтрации ткани клетками воспаления. **Заключение.** Предложенный в работе способ оценки состояния ЭСЖ может применяться в офтальмологических исследованиях, в частности при изучении развития синдрома сухого глаза и тестировании средств его терапии.

Ключевые слова: млекопитающие, экстраорбитальная слезная железа, возрастзависимые изменения, дистрофия, воспаление

Для цитирования: Новикова Ю.П., Григорян Э.Н. Оценка возрастзависимых гистопатологических изменений, происходящих в слезной железе стареющих крыс Wistar Офтальмология. 2024;21(1):205-213. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-1-205-213>

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

Финансирование работы: Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2022 года (№ 0088-2024-0014).

Конфликт интересов отсутствует.

Благодарности: Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2022 года (№ 0088-2024-0014). Авторы выражают благодарность сотрудникам группы проф. П.П. Филиппова (МГУ) за предоставление животных.



Assessment of Age-related Histopathological Changes Occurring in the Lacrimal Gland of Aging Wistar Rats

Yu.P. Novikova, E.N. Grigoryan

N.H. Holtzov Institute of Developmental Biology, RAS
Vavilova str., 26, Moscow, 119334, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2024;21(1):205–213

Purpose. Wistar rats are often used in ophthalmological studies and in testing substances having therapeutic effects. The condition of the eyes of these animals, as well as other mammals, including humans, in the normal state, pathology, and aging, depends on the work of the lacrimal glands. The aim of this study was to develop convenient approaches for determining age-dependent histopathological changes in the exorbital lacrimal glands (ELGs) of aging rats. **Material and methods.** Isolated ELGs obtained from Wistar rats aged of 8 and 11 months served as a material of the study. Changes in the structure of ELGs were evaluated using methods of computer analysis of morphological patterns and quantitative data processing. **Results.** The functioning and state of the ELGs are reflected in their dramatic structural changes and progressive inflammation. Our study proposes a simple way to assess the state of ELGs in aging rats using methods of morphology and computer programs. Using the proposed approach, it was shown that in the period from 8 to 11 months of postnatal development, significant age-related changes occur in aging rats. Changes manifest in the progress of parenchymal degeneration and progressive infiltration of the tissue by inflammatory cells. **Conclusions.** The proposed method of ELG state's evaluation can be used in ophthalmological studies, and in particular, when studying the development of "dry eye" syndrome and testing the means of its therapy.

Keywords: mammals, lacrimal gland, age-related changes, degeneration, inflammation

For citation: Novikova Yu.P., Grigoryan E.N. Assessment of Age-related Histopathological Changes Occurring in the Lacrimal Gland of aging Wistar Rats. *Ophthalmology in Russia*. 2024;21(1):205–213. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-1-205-213>

The work was carried out using the equipment of the Center named after N.H. Holtzov.

The work was carried out within the framework of the section of the State Assignment 2022 (No. 0088-2024-0014).

There is no conflict of interests.

Acknowledgement: This work was funded by the Government Program of Basic Research at the Holtzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences in 2022, No. 0088-2024-0014. The authors express their gratitude to the staff of the group of Prof. P.P. Filippov (MSU) for providing animals.

ВВЕДЕНИЕ

Состояние глаза в норме и при патологии во многом зависит от работы слезных желез [1]. Структура и изменения эксорбитальной слезной железы (ЭСЖ) хорошо описаны ранее [2–4]. Расположенная суперлатерально от глазного яблока ЭСЖ представляет собой мультилобулярную ткань, состоящую из ацинарных, миоэпителиальных клеток, клеток протоков, кровеносных и лимфатических сосудов. ЭСЖ окружена соединительнотканной капсулой, от которой вглубь отходят соединительнотканые септы. Септы разветвляются на малые и делят паренхиму ЭСЖ на группы клеток — ацинусы, являющиеся структурными и функциональными единицами ЭСЖ. Клетки ацинусов в норме не обладают ярко выраженным полиморфизмом, однако их изменения с возрастом и при патологии могут быть весьма разнообразны [4]. Ацинарные клетки составляют примерно 80 % от всех клеток ЭСЖ и являются местом синтеза, накопления и секреции сильно гликозилированных белков высокого молекулярного веса, в том числе муцинов. Секретируемые муцины обеспечивают не только присутствие слезной, смазывающей пленки (лубриканта) на поверхности роговицы и конъюнктивы, но и наличие барьера от патогенов. Производимые клетками ЭСЖ ростовые факторы (EGF, TGF, KGF) служат поддержанию

дифференцировки, пролиферации и жизнеспособности клеток эпителия роговицы [5]. Процессы секреции в ЭСЖ находятся под нервно-гормональным контролем, который осуществляется симпатической и парасимпатической системами [5, 6].

Известны гормоны, от влияния которых зависит работа ЭСЖ. Действием на ЭСЖ обладают адренокортикотропный гормон (АКТН), α -меланоцитстимулирующий гормон (α -MSH), пролактин, андрогены, эстрогены, а также прогестероны [7, 8]. По этой причине степень выраженности патологических изменений, происходящих в ЭСЖ, различается в зависимости от пола. При исследовании крыс разного пола в отношении недостаточности функции ЭСЖ и развития синдрома сухого глаза большая тяжесть патологии обнаруживается у самок [9].

На моделях экспериментально индуцированного воспаления ЭСЖ выяснено, что в условиях воспаления ацинарные клетки претерпевают апоптоз и аутофагию [10]. Предполагается, что ацинарные клетки ЭСЖ в молодом организме не пролиферируют, однако существует вероятность конверсии клеток миоэпителия ацинусов и мезенхимных стволовых клеток в производящие секрет ацинарные клетки [10, 11]. В норме миоэпителиальные клетки поддерживают структуру ацинусов

Ю.П. Новикова, Э.Н. Григорян

и функционирование их протоков. Сокращение миоэпителия за счет наличия в клетках α -гладкомышечного актина (α -SMA) дает возможность секретируемой ацинарными клетками жидкости продвигаться в протоки.

ЭСЖ пронизана сосудами, окруженными соединительнотканной оболочкой. Сосудистая сеть является поставщиком клеток воспалительного ряда для ЭСЖ [10, 12, 13]. В норме проникновение большого количества лейкоцитов в ткань железы молодых животных не наблюдается, в ней можно встретить только немногочисленные Т- и В-лимфоциты и макрофаги.

В настоящее время в человеческой популяции велико распространение синдрома сухого глаза, который часто рассматривается как результат воздействия внешних факторов, а также развивающегося с возрастом хронического воспаления в слезных железах [10, 12]. Помимо воспаления, с возрастом в ЭСЖ происходят и другие негативные явления: снижение секреторного ответа на воздействие нейтральных агонистов, драматические структурные изменения, апоптоз и аутофагия ацинарных клеток [14, 15]. Все эти процессы проходят в сопровождении фокальной инфильтрации железы Т- и В-клетками, роста числа тучных клеток и макрофагов, накопления липофусцина, развития атрофии и фиброза. Для человека описано участие слезных желез не только в патогенезе синдрома сухого глаза, но и в развитии дакриостеноза и дакриолитиаза, основной причиной которых является хроническое воспаление ЭСЖ [1].

Возрастзависимые изменения морфологии и функции ЭСЖ у крыс были предметом изучения ранее [4, 16–18]. Результаты исследований свидетельствовали о развитии комплекса взаимосвязанных патологических изменений в ЭСЖ. В совокупности обнаружены: утолщение соединительнотканной оболочки, хроническое воспаление, увеличение размеров и разрушение протоков, изменения лобулярного паттерна, набухание ацинусов, гибель ацинарных клеток, изменения их морфологии, фиброз, аккумуляция липофусцина и т.д. Отмечено, что патологические изменения в ЭСЖ стареющих крыс нарастают с высокой скоростью. Возрастзависимые изменения выявлены и для слезных желез человека [19]. У человека отмечены атрофия ацинусов, периацинарный и перидуктальный фиброз, массивная инфильтрация лимфоцитами. Быстрое нарастание патологии ЭСЖ у человека, как и у крыс, происходит с возрастом и различается по скорости и значимости в зависимости от пола [9, 19, 20]. Крысы часто служат моделью в исследованиях синдрома сухого глаза, как и многих других офтальмологических заболеваний [21]. Современные исследования показывают, что ЭСЖ крыс и человека в целом сходны, а существующие отличия касаются деталей гистоархитектуры, цитокератинового профиля в ткани, а также наличия тучных клеток в ЭСЖ крыс, но не человека [22]. Ранее, в соответствии с проведенными нами оценками ретиального пигментного эпителия,

крысы Wistar, использованные также в данной работе, рано демонстрируют признаки старения [23].

В данной статье мы предлагаем несложную и объективную количественную оценку состояния ЭСЖ стареющих крыс Wistar по двум основным показателям: 1) деструкция/дистрофия паренхимы ЭСЖ и 2) развитие воспаления в этой ткани. Полученные результаты и предложенный метод могут служить не только для оценки возрастзависимых изменений ЭСЖ. Они могут быть удобными при моделировании и оценке повреждений ЭСЖ, вызванных различными факторами, в частности противоопухолевой терапией с использованием высоких доз радиоактивного йода (RAI) [24, 25], а также при тестировании фармпрепаратов, компенсирующих развитие возрастной и другой патологии ЭСЖ, и возрастзависимого синдрома сухого глаза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

При выполнении исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными соответствовали международным нормам по биоэтике и правилам этического комитета ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН.

Выделение экстраорбитальных слезных желез и их подготовка для гистопатологического исследования. Экстраорбитальные слезные железы (ЭСЖ, *gl. lacrimalis exoorbitalis*) изолировали унилатерально у стареющих самцов крыс альбиносов Wistar (ИЦИГ РАН) после анестезии. Хирургические процедуры проводили в соответствии с ранее разработанными и описанными в литературе [26]. Перед операцией крыс содержали по 5 особей в клетке при естественном освещении и свободном доступе к стандартному корму и воде. В эксперименте использовали крыс в возрасте 8 и 11 мес. после рождения, для каждого из сроков получали по 5 образцов ЭСЖ. Сроки фиксации ЭСЖ относились к взрослым и позднеговозрастным крысам, т.е. срокам, по нашим предварительным наблюдениям, быстрого развития возрастзависимых изменений. Выделенные ЭСЖ фиксировали в растворе Буэна (24 часа), фиксатор многократно отмывали 70° этанолом. Затем проводили дегидратацию образцов и заливку в гистомикс по протоколу: 70° этанол (3 × 20 мин + 1 × 24 часа); 80° этанол + бутанол (3:1, 20 мин); 96° этанол + бутанол (1:1, 15 мин); 100° этанол + бутанол (1:3, 2 × 15 мин); бутанол (2 × 20 мин); гистомикс (2 × 45 мин). Данный протокол обеспечивал максимальную сохранность нативной структуры ЭСЖ, исключал пересушивание и сжатие ткани. В заливочной среде образцы ориентировали для получения поперечных срезов ЭСЖ. Срезы толщиной 7 мкм получали от трех областей ЭСЖ: периферической, ближайшей к глазу; центральной области и области выхода крупных протоков (ближайшей к уху крысы). Срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилин-эозином.

При изучении морфологии ЭСЖ анализировали каждый третий из серии срезов, полученных для перечисленных трех зон каждого из 5 образцов желез, относящихся к каждому из 2-х сроков. Использовали микроскоп Olympus H3 и режимы увеличений от 40× до 1000×.

Количественное исследование с помощью компьютерных программ. Растровые изображения получали для трех указанных зон (суммарно не менее 20–25) для каждого из образцов ЭСЖ. Работу проводили при едином режиме работы микроскопа и при одном увеличении (Ок. 10×; Об. 20×). Данное увеличение позволяло анализировать относительно большие области ЭСЖ, но с достаточной для исследования детализацией. Изображения получали с помощью микроскопа Olympus H3, оснащенного цифровой камерой и компьютерной программой Lite. После этого полученные изображения обрабатывали с помощью программ компьютера. Использовали графический редактор Adobe Photoshop CS3 Extended (version 10.0) и специально разработанную последовательность команд (Actions) с применением

инструментов редактора. Для анализа брали случайные участки паренхимы ЭСЖ одного размера (16×10^4 px), свободные от других тканей: крупных сосудов, основных протоков и септ, жировой ткани. С помощью компьютера в выделенных зонах цветом, значительно отличным от фона, «прокрашивали» участки запусков (области паренхимы ЭСЖ, полностью свободные от окрашенных гематоксилин-эозином) (рис. 1). Площадь прокрашенных с помощью компьютера контрастным цветом запусков соотносили с общим размером выделенной области и рассчитывали относительную площадь запусков ткани паренхимы ЭСЖ в %. Статистическую обработку данных проводили с помощью Microsoft Office Excel 2007. Рассчитывали средние значения показателей для каждого возраста, среднеквадратичные отклонения и дисперсионный анализ выборок для определения достоверности отличий в выборках. $P < 0,05$ считался статистически значимым.

Количественное исследование очагов инфильтрации ЭСЖ клетками воспалительного ряда. Проводили прямую визуальную регистрацию очагов инфильтрации клетками воспаления во всех 5 образцах ткани на срезах ЭСЖ, полученных от крыс 8 и 11 мес. Чтобы избежать погрешности, учитывали крупные многоклеточные локусы. Единичные клетки воспалительного ряда и/или их малочисленные группы в расчет не принимали. Области инфильтрации выявляли при увеличении микроскопа 100×, позволяющем видеть пространство ЭСЖ на срезе и оценивать локализацию и размеры очагов воспаления. Подсчитывали общее число фокальных инфильтратов на 100 срезах каждого из образцов ЭСЖ, затем определяли среднее их число в ткани желез в пересчете на один срез (7 мкм). Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с помощью Microsoft Office Excel 2007. Был сделан расчет средних значений показателей для каждого возраста, среднеквадратичных отклонений и дисперсионный анализ выборок для определения достоверности отличий в выборках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах использовали крыс альбиносов Wistar в возрасте 8 и 11 мес. По сведениям литературы [16, 17] и нашим предварительным наблюдениям именно в этот период возрастзависимые изменения в ЭСЖ становятся морфологически выраженными, быстро нарастают, но при этом не приводят к полной деструкции ЭСЖ.

ЭСЖ крыс 8 мес. на периферии и в центре имеют нормальное состояние, свидетельствующее о сохранении структуры и, таким образом, функционирования. Отдельные лобулы содержат ацинарные клетки с редко расположенными интеркалярными протоками. Признаки деструкции можно отметить в редких случаях, они затрагивают малые области паренхимы и заключаются в расширении протоков ацинусов и частичной утере ацинарных клеток (рис. 2а). Как правило, все составляющие ЭСЖ

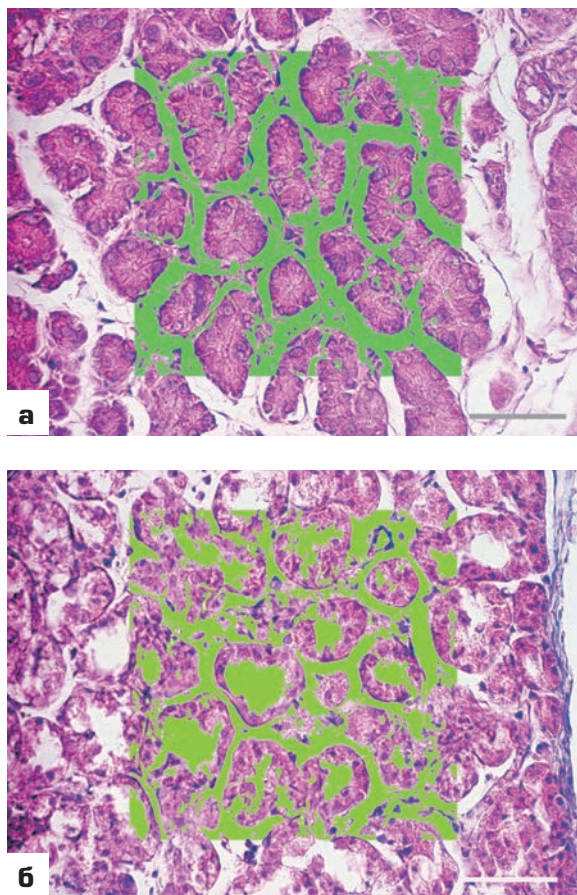


Рис. 1. Прокрашивание «пустот» в паренхиме ЭСЖ с помощью наложения второго цвета. Размер площадок 16×10^4 пикселей: а — 8 мес; б — 11 мес., масштабный отрезок — 100 мкм

Fig. 1. Coloring of “voids” in the ELG parenchyma by applying a second color. The size of the platforms is 16×10^4 pixels: а — 8 mo; б — 11 mo, scale: 100 μ

ткани: ацинусы и их секреторные клетки, миоэпителий, протоки, кровеносные сосуды и соединительная ткань имеют нормальное строение и локализацию (рис. 2б, в). Цитоплазма ацинарных клеток структурирована, наполнена эозинофильным секретом (рис. 3г), а просветы капилляров — клетками крови (рис. 2в, г). ЭСЖ крыс 8 мес. имеют развитую соединительную ткань, ее тонкая сеть идентифицируется вокруг протоков, сосудов и межлобулярных пространств без заметного уплотнения (фиброза) (рис. 2б). По объемам соединительной ткани вокруг лобул и в септах существует разнообразие, отражающее отличия по этому параметру в разных зонах ЭСЖ. При сравнении паренхимы трех исследуемых зон ЭСЖ заметных отличий не наблюдается, отличия в зонах касаются топологических различий по числу и расположению крупных протоков, сосудов и септ.

У крыс в возрасте 11 мес. морфология ткани ЭСЖ значительно отличается от описанной для 8-месячных крыс.

ЭСЖ представлена паренхимой, состоящей из рыхло расположенных ацинусов со значительно увеличенными внутренними протоками и протоками между лобул. Однако основное отличие заключается в разворачивающейся дегенерации большинства долек ЭСЖ, хотя по пространству железы можно встретить как дегенерирующие, так и нормальные доли в окружении мезенхимных клеток и разрушающего миоэпителия ацинусов (рис. 3а–г). На рисунках 3а, б очевидно запустевание, отсутствие прокрашивания гематоксилин-эозином на больших пространствах железы. Можно предположить, что разрушение паренхимы и миоэпителия приводит к нарушению производства и оттока секрета и, как результат, скоплению последнего в кавернах ЭСЖ. Ацинусы, претерпевающие дегенерацию, как правило, содержат большие просветы, где присутствуют малые количества секрета или секрет вовсе отсутствует. Просветы ацинусов обладают нерегулярной структурой, что свидетельствует

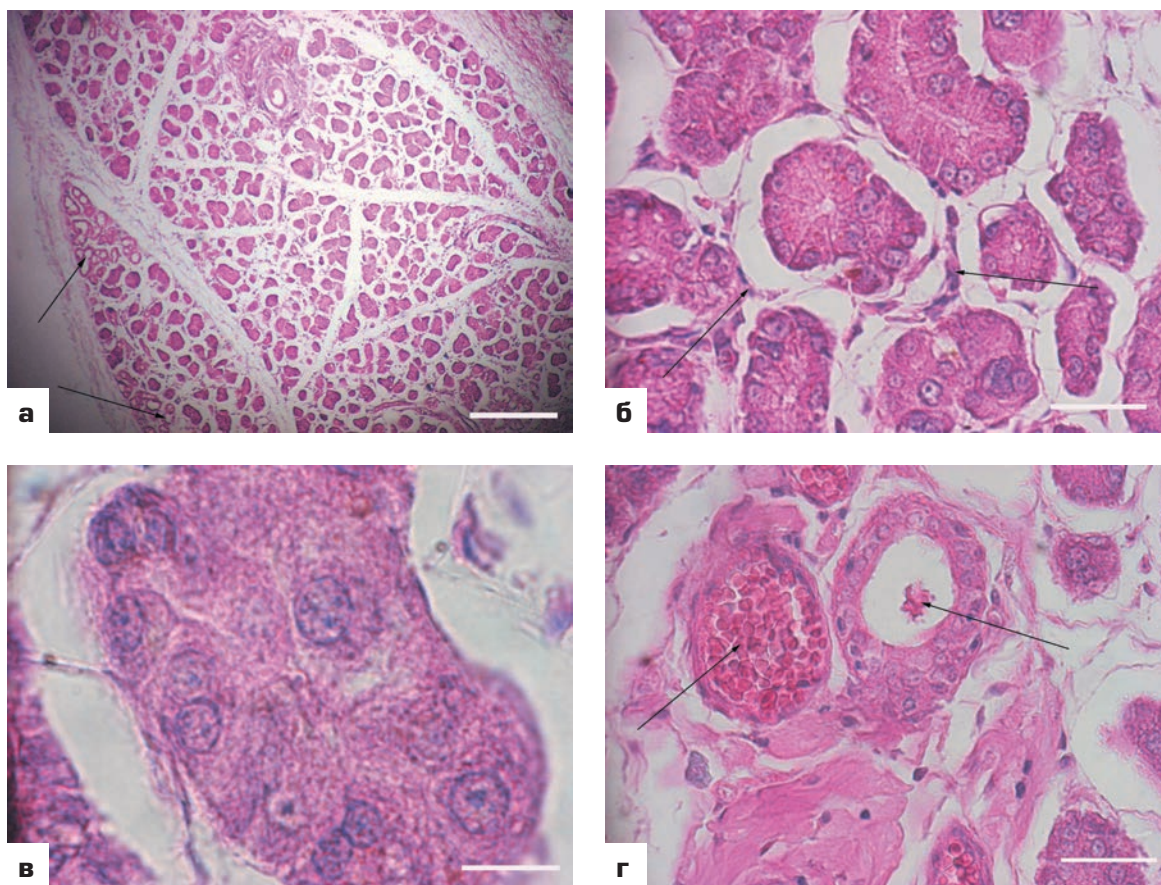


Рис. 2. Морфология слезной железы крыс Wistar в возрасте 8 мес.: а — общий вид. Стрелками указаны малые области с признаками дистрофии. Масштабный отрезок 250 мкм; б — здоровые ацинусы, окруженные клетками соединительной ткани и миоэпителием (стрелки), масштабный отрезок 100 мкм; в — индивидуальный ацинус, масштабный отрезок 20 мкм. Видно заполнение секретом цитоплазмы ацинарных клеток; г — клетки крови в просвете капилляра (стрелка слева) и остатки секрета в протоке (стрелка справа), масштабный отрезок 100 мкм

Fig. 2. Morphology of the lacrimal gland of Wistar rats aged 8 mo: a — general view. The arrows indicate small areas with signs of degeneration. Scale: 250 μ ; б — healthy acini surrounded by connective tissue cells and myoepithelium (arrows), scale: 100 μ ; в — individual acinus, scale: 20 μ . The filling of the cytoplasm of acinar cells with the secret is visible; г — blood cells in the lumen of the capillary (arrow on the left) and the remains of the secret in the duct (arrow on the right), scale: 100 μ

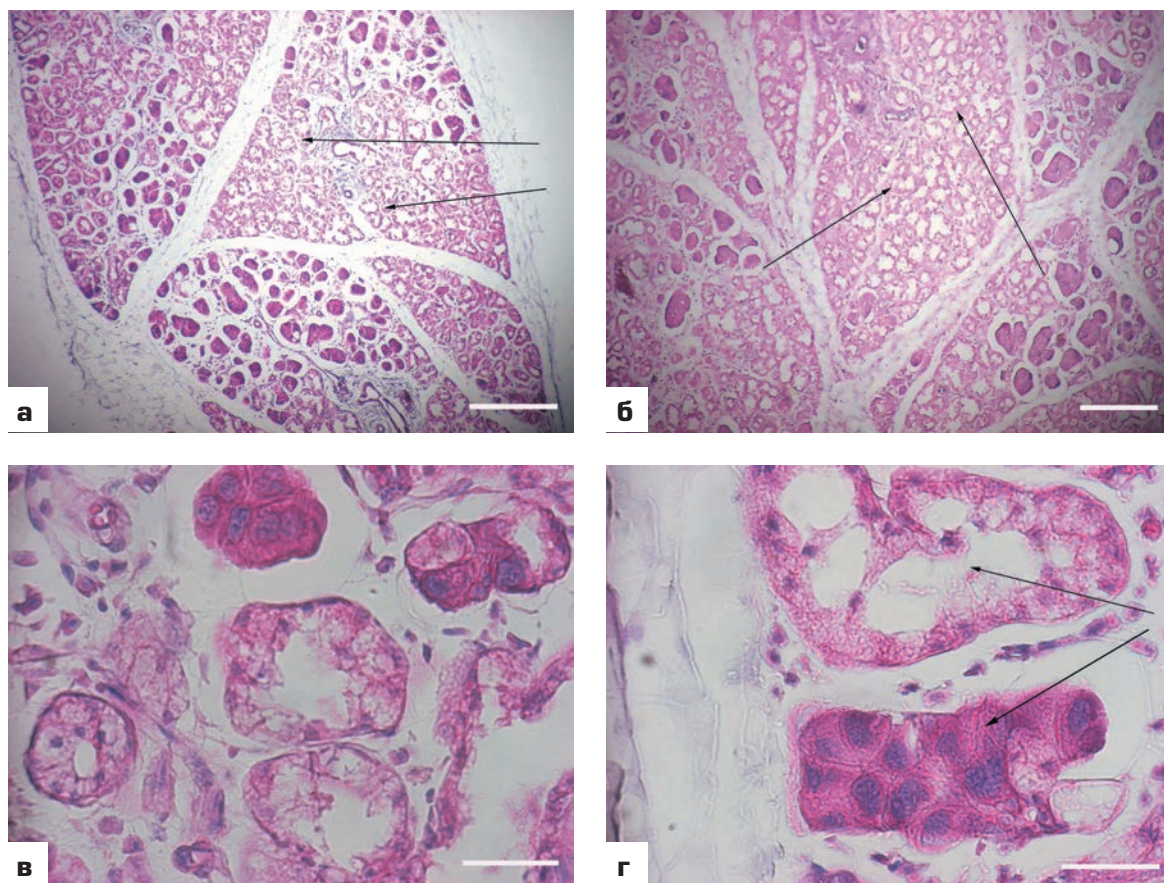


Рис. 3. Морфология слезной железы крыс Wistar в возрасте 11 мес.: а, б — общий вид. Стрелками указаны обширные области с признаками дистрофии, масштабный отрезок 250 мкм (а) и 100 мкм (б); в — ацинусы на разных уровнях процесса разрушения, масштабный отрезок 50 мкм; г — сходное при большем увеличении, масштабный отрезок 20 мкм

Fig. 3. Morphology of the lacrimal gland of Wistar rats at the age of 11 mo: а, б — general view. The arrows indicate extensive areas with signs of degeneration, scale: 250 μ (а) and 100 μ (б); в — acini at different levels of the destruction process, scale: 50 μ ; г — similar at higher magnification, scale 20 μ

о разрушении внутренней мембраны и нарушении полярности ацинарных клеток. Дегенерация ацинусов, проявляющаяся в гибели секреторных клеток и потере их связи с мембранами, находится в различной степени выраженности (рис. 3в, г).

Параллельно отмечено, что деструкция редко затрагивает только отдельные клетки ацинусов, в процесс разрушения, как правило, включены все клетки ацинусов. Подобное отмечалось и ранее в ультраструктурных исследованиях ЭСЖ крыс [18]. Признаки дегенерации и разрушения мы наблюдали чаще по поверхности ЭСЖ, чем в толще. Вероятно, это связано с тем, что кровеносные сосуды находятся в глубоких слоях ЭСЖ и там обеспечивают трофику и снабжение кислородом в большей степени, чем на периферии. По этой причине центральная часть ЭСЖ (зона 2) как правило, имела большую сохранность при сравнении с латеральными областями.

Количественные морфометрические измерения, проведенные с помощью компьютерных программ на растровых изображениях в образцах слезных желез,

взятых от крыс 8 и 11 мес., подтвердили морфологические наблюдения, свидетельствующие о нарастающей с возрастом дегенерации ЭСЖ. В паренхиме изменения касались деструкции ацинарных клеток, а также резкого возрастания числа значительно расширенных протоков и их ветвей, все больше занимающих основной объем паренхимы ЭСЖ. На рисунках 4 а, б представлены результаты подсчетов относительной средней, занятой пустотами площади ткани ЭСЖ. Запустевание в ткани слезной железы отражает уровень клеточной гибели, размеры не содержащей синтезируемый продукт цитоплазмы клеток, значительное увеличение просветов внутри ацинусов и лобул, а также рост числа и ветвления протоков. Все эти явления неоднократно отмечались ранее и были сопряжены с дегенерацией паренхимы слезной железы и системы ее протоков [4, 10, 11, 16, 18]. Таким образом, выбранный нами показатель является очевидным отражением возрастзависимого разрушения ЭСЖ. При сравнении данных по двум возрастам крыс мы видим, что за период с 8 по 11 мес. у крыс происходят

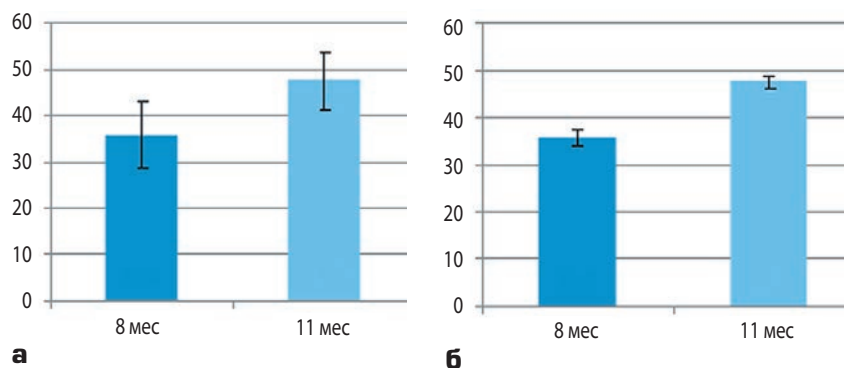


Рис. 4. Средняя площадь, занятая пустотами, относительно общей площади паренхимы слезной железы у крыс 8 и 11 мес. По оси ординат — проценты. В вычислениях использованы статистическое отклонение (а) и ошибка среднего (б). $P = 0,0001$

Fig. 4. The average area occupied by "voids", relative to the total area of the lacrimal gland parenchyma in rats of 8 and 11 mo. On the ordinate axis — percentages. Statistical deviation (a) and mean error (b) were used in the calculations. $P = 0.0001$

существенные изменения, не приводящие, однако, к массовой гибели клеток, разрушению больших объемов ткани и замещению их фиброзной тканью, т.е. к явлениям, характерным для крыс в возрасте 24 и более месяцев [27].

Количественный анализ развития процесса лимфатической инфильтрации в ЭСЖ крыс 8 и 11 мес. Особое внимание уделялось областям расположения протоков и сосудов, где лимфатическая инфильтрация, как правило, инициируется и затем быстро прогрессирует. У 8-месячных крыс эти зоны были свободны от крупных скоплений клеток воспалительного ряда (рис. 5а). При этом обнаруживались и учитывались в подсчетах скопления клеток

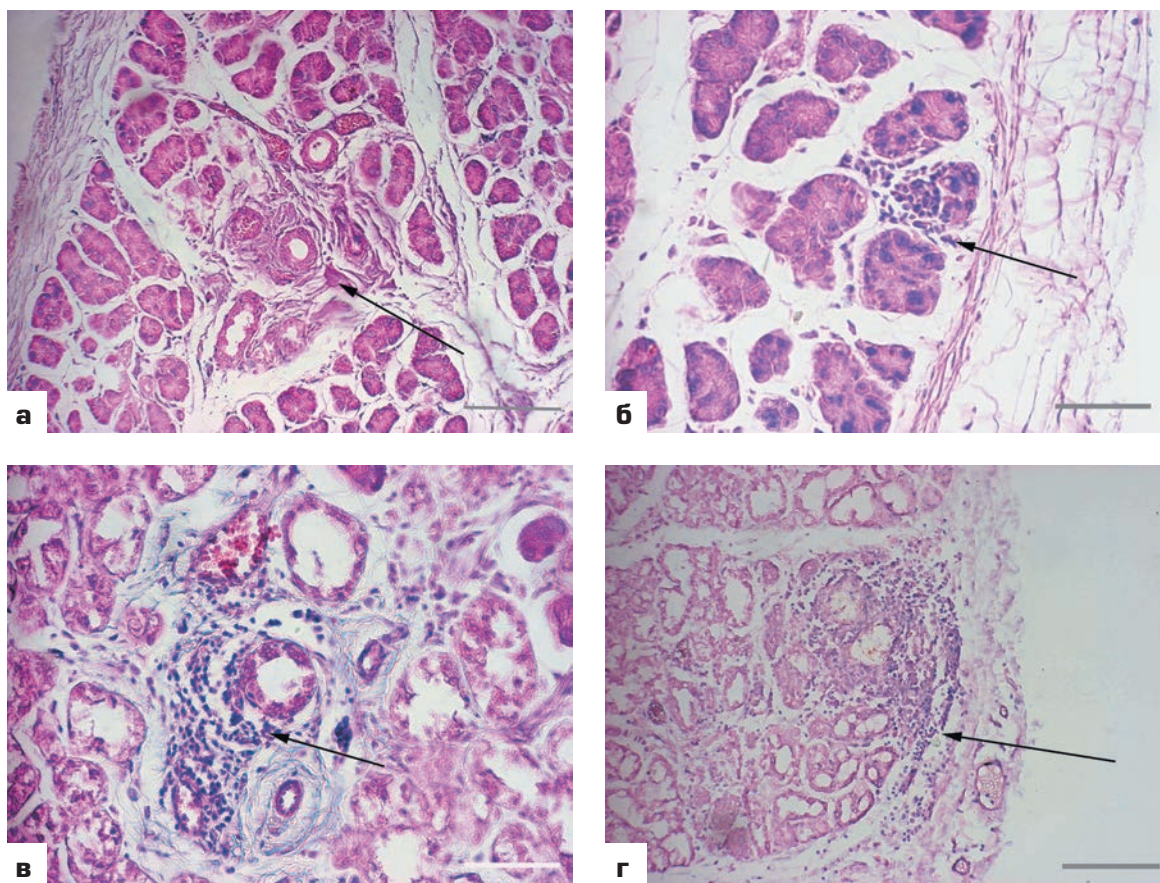


Рис. 5. Морфология слезной железы крыс Wistar в возрасте 8 мес. (а, б) и 11 мес. (в, г): а — общий вид. Стрелкой указана область локализации протоков и капилляров, очевидно отсутствие клеток воспалительного ряда, масштабный отрезок 200 мкм; б — случай наличия малого инфильтрата (стрелка) под капсулой железы, масштабный отрезок 100 мкм; в — общий вид. Стрелкой указана перидуктальная инфильтрация, масштабный отрезок 100 мкм; г — стрелкой указана обильная подкапсулярная инфильтрация клетками воспалительного ряда, масштабный отрезок 200 мкм

Fig. 5. Morphology of the lacrimal gland of Wistar rats aged 8 (a, b) and 11 mo. (v, g): a — general view. The arrow indicates the area of localization of ducts and capillaries, the absence of inflammatory cells is obvious, scale: 200 μ ; b — the case of a small infiltrate (arrow) under the gland capsule, scale: 100 μ ; v — general view. The arrow indicates periductal infiltration, scale: 100 μ ; g — the arrow indicates abundant subcapsular infiltration by inflammatory cells, scale: 200 μ

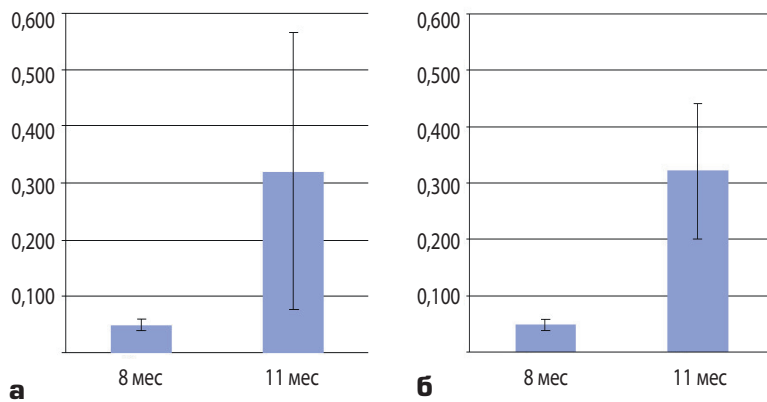


Рис. 6. Среднее число инфильтратов на 1 срез ткани слезной железы в контролях 8- и 11-месячных крыс Wistar. В вычислениях использованы статистическое отклонение (а) и ошибка среднего (б). $P = 0,05$

Fig. 6. The average number of infiltrates per 1 slice of lacrimal gland tissue in controls of 8- and 11-month-old Wistar rats. Statistical deviation (a) and mean error (b) were used in the calculations. $P = 0.05$

невысокой численности, локализованные под капсулой ЭСЖ либо в межлобулярных пространствах (рис. 5б). При больших разрешениях микроскопа здесь идентифицировались отдельные макрофаги, тучные клетки и лимфоциты.

У 11-месячных крыс инфильтрация уже не была редким событием, выявлялась во всех образцах и имела объемы, свидетельствующие о значительном прогрессе воспаления в ЭСЖ. Как правило, его очаги были локализованы в перидуктальных пространствах и вокруг сосудов, а также вблизи капсулы железы (рис. 5в, г), что соответствует данным литературы [28].

Следует отметить большую вариабельность числа инфильтратов в образцах ЭСЖ разных животных, что с большой вероятностью отражает индивидуальные отличия в популяции крыс Wistar. Результаты вычисления среднего числа инфильтратов на 1 срез ткани ЭСЖ представлены на рисунке 6. Несмотря на вариабельность степени лимфатической инфильтрации в ЭСЖ в группе крыс 11 мес., в целом данные свидетельствуют о значительном увеличении риска воспаления за период от 8 до 11 мес.

Инфильтрирующие ЭСЖ лимфоциты являются высоко жизнеспособными и не входят в апоптоз, постоянно ингибируя процесс секреции в еще жизнеспособных клетках железы [10]. Возникновение воспаления в ЭСЖ

часто связано с повреждением поверхности глаза, роговицы и конъюнктивы. Возникшая воспалительная реакция в комплексе роговица ↔ слезная железа, в свою очередь, обладает потенцирующим влиянием и постепенно переходит в хроническую фазу [29–31]. Развивающееся с возрастом хроническое воспаление, а также оксидативный стресс в слезной железе и являются основной причиной ее деградации и сопряженного с ней синдрома сухого глаза [32–34]. Обнаруженное нами развитие хронического воспаления в ткани ЭСЖ параллельно с выявленной ее деструкцией подтверждает эти наблюдения. Особенностью данных процессов у крыс Wistar являются их раннее проявление и развитие. Раннее возникновение данных нарушений, как и в других в тканях глаза, может быть связано с альбинизмом этих животных [23, 35, 36]. При этом крысы-альбиносы Wistar часто служат животной моделью во многих, в том

числе офтальмологических, исследованиях. Полученные в работе данные говорят о необходимости учитывать рано проявляющиеся выявленные в ЭСЖ этих животных возрастзависимые патологические изменения. Предложенный способ позволяет осуществить быструю их оценку в контрольных тестах и использовать в исследованиях по эффективности разрабатываемых терапевтических средств в отношении синдрома сухого глаза.

ВЫВОДЫ

Предложен простой подход к анализу состояния ЭСЖ, включающий его патоморфологическую и компьютерную оценку у стареющих крыс Wistar. Обнаружено, что в возрасте с 8 по 11 мес. у крыс Wistar происходит старение ЭСЖ, проявляющееся в прогрессе дегенерации паренхимы и воспалительной инфильтрации. Предложенные способы оценки ЭСЖ могут применяться в офтальмологических исследованиях и при тестировании фармакологических препаратов.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Новикова Ю.П. — разработка концепции и дизайна исследования, сбор данных и их интерпретация, написание статьи и финальная подготовка проекта статьи к публикации;

Григорян Э.Н. — разработка концепции и дизайна исследования, сбор данных и их интерпретация, написание статьи и финальная подготовка проекта статьи к публикации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Paulsen F. Cell and molecular biology of human lacrimal gland and nasolacrimal duct mucins. *Int. Rev. Cytol.* 2006;249:229–279. doi: 10.1016/S0074-7696(06)49005-7.
- Hughes GK, Miszkil KA. Imaging of the lacrimal gland. *Semin Ultrasound CT MR.* 2006;27(6):476–491. doi: 10.1053/j.sult.2006.09.002.
- Schechter JE, Warren DW, Mircheff AK. A lacrimal gland is a lacrimal gland, but rodent's and rabbit's are not human. *Ocul. Surf.* 2010;8(3):111–134. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70222-7.
- Гончарова ОС, Манских ВН. Возрастные изменения в слезной железе крыс: яркая морфология, неясная природа. *Онтогенез.* 2014;45(5):289–298. doi: 10.7868/S047514501405005X.
- Gancharova OS, Mansikh VN. Age-related changes in the rat lacrimal gland: specific morphology and unknown nature. *Ontogenesis.* 2014;45(5):289–298 (In Russ.). doi: 10.1134/S1062360414050051.
- Hodges RR, Dartt DA. Regulatory pathways in lacrimal gland epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 2003;231:129–196. doi: 10.1016/s0074-7696(03)31004-6.
- Dartt DA. Dysfunctional neural regulation of lacrimal gland secretion and its role in the pathogenesis of dry eye syndromes. *Ocul. Surf.* 2004;2(2):76–91. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70146-5.
- Warren DW. Hormonal influences on the lacrimal gland. *Int. Ophthalmol. Clin. Winter.* 1994;34(1):19–25. doi: 10.1097/00004397-199403410-00004.

8. Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM. Influence of gender, sex steroid hormones, and the hypothalamic-pituitary axis on the structure and function of the lacrimal gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998;438:11–42. doi: 10.1007/978-1-4615-5359-5_2.
9. Skrzynecki J, Tomasz H, Ciepiaszuk K. Variability of dry eye disease following removal of lacrimal glands in rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1153:109–115. doi: 10.1007/5584_2019_348.
10. Zoukhri D, Fix A, Alroy J, Kublin CL. Mechanisms of murine lacrimal gland repair after experimentally induced inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49(10):4399–4406. doi: 10.1167/iops.08-1730.
11. Zoukhri D. Mechanisms involved in injury and repair of the murine lacrimal gland: role of programmed cell death and mesenchymal stem cells. *Ocul. Surf.* 2010;8(2):60–69. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70070-8.
12. Stern ME, Pflugfelder SC. Inflammation in dry eye. *Ocul. Surf.* 2004;2:124–130. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70148-9.
13. Stern ME, Pflugfelder SC. What We Have Learned from Animal Models of Dry Eye. *Int. Ophthalmol. Clin.* 2017;57(2):109–118. doi: 10.1097/IIO.0000000000000169.
14. Ríos JD, Horikawa Y, Chen LL. Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response. *Exp. Eye Res.* 2005;80(4):477–491. doi: 10.1016/j.exer.2004.10.012.
15. Rocha EM, Alves M, Rios JD, Dartt DA. The Aging Lacrimal Gland: Changes in Structure and Function. *Ocul. Surf.* 2008 Oct;6(4):162–74. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70177-5.
16. Draper CE, Adeghate EA, Singh J, Pallot DJ. Evidence to suggest morphological and physiological alterations of lacrimal gland acini with ageing. *Exp. Eye Res.* 1999;68(3):265–276. doi: 10.1006/exer.1998.0605.
17. Draper CE, Singh J, Adeghate E. Effects of age on morphology, protein synthesis and secretagogue-evoked secretory responses in the rat lacrimal gland. *Mol. Cell Biochem.* 2003;248:7–16. doi: 10.1023/a:1024159529257.
18. Vais VB, Vangeli IM, Bakeeva LE. Ultrastructural changes in ageing lacrimal gland in Wistar rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014;157(2):268–272. doi: 10.1007/s10517-014-2542-9.
19. Obata H. Anatomy and histopathology of the human lacrimal gland. *Cornea.* 2006;25:S82–S89. doi: 10.1097/01.icc.0000247220.18295.d3.
20. Obata H, Yamamoto S, Horiuchi H, Machinami R. Histopathologic study of human lacrimal gland. Statistical analysis with special reference to aging. *Ophthalmology.* 1995;102:678–686. doi: 10.1016/s0161-6420(95)30971-2.
21. Huang W, Tourmouzis K, Perry H, Honkanen RA, Rigas B. Animal models of dry eye disease: Useful, varied and evolving (Review). *Exp. Ther. Med.* 2021;6:1394. doi: 10.3892/etm.2021.10830.
22. Wood JPM, Chidlow G, Halliday LA, Casson RJ, Selva D, Sun M. Histochemical Comparison of Human and Rat Lacrimal Glands: Implications for Bio-Engineering Studies. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 2022;11(11):10. doi: 10.1167/tvst.11.11.10.
23. Новикова ЮП, Григорян ЭН. Раннее появление признаков старения в ретинальном пигментном эпителии у молодых крыс альбиносов. *Онтогенез.* 2020;51(6):440–449.
- Novikova YuP, Grigoryan EN. Early Appearance of Aging Signs in Retinal Pigment Epithelium in Young Albino Rats. *Ontogenesis.* 2020;51(6):440–449 (In Russ.). doi: 10.31857/S0475145020060063.
24. Eksioglu U, Atilgan HI, Yakin M. Antioxidant effects of vitamin D on lacrimal glands against high dose radioiodine-associated damage in an animal model. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2019;38(1):18–24. doi: 10.1080/15569527.2018.1498507.
25. Koca G, Singar E, Akbulut A. The Effect of Resveratrol on Radioiodine Therapy-Associated Lacrimal Gland Damage. *Curr. Eye Res.* 2021;46(3):398–407. doi: 10.1080/02713683.2020.1803920.
26. Mecum NE, Cyr D, Malon J, Demers D, Cao L, Meng ID. Evaluation of Corneal Damage After Lacrimal Gland Excision in Male and Female Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2019;60(10):3264–3274. doi: 10.1167/iops.18-26457.
27. Draper CE, Adeghate E, Lawrence PA. Age-related changes in morphology and secretory responses of male rat lacrimal gland. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1998;69:173–183. doi: 10.1016/s0165-1838(98)00026-5.
28. Fox R. Sjögren's syndrome. *Lancet.* 2005;366(9482):321–331. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66990-5.
29. Mathers WD. Why the eye becomes dry: a cornea and lacrimal gland feedback model. *CLAO J.* 2000;26(3):159–165.
30. Knop E, Knop N, Brewitt H. Dry eye disease as a complex dysregulation of the functional anatomy of the ocular surface. New concepts for understanding dry eye disease. *Ophthalmology.* 2003;110(11):917–928. doi: 10.1007/s00347-003-0935-7.
31. Yamaguchi T. Inflammatory Response in Dry Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018;59:DES192–199. doi: 10.1167/iops.17-23651.
32. Batista TM, Tomiyoshi LM, Dias AC. Age-dependent changes in rat lacrimal gland anti-oxidant and vesicular related protein expression profiles. *Mol. Vis.* 2012;18:194–202.
33. Chistyakov DV, Gancharova OS, Baksheeva VE. Inflammation in Dry Eye Syndrome: Identification and Targeting of Oxylipin-Mediated Mechanisms. *Biomedicines.* 2020;8:344. doi: 10.3390/biomedicines8090344.
34. Souza RG, Yu Z, Hernandez H. Modulation of Oxidative Stress and Inflammation in the Aged Lacrimal Gland. *Am. J. Pathol.* 2021;191(2):294–308. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.10.013.
35. Grønskov K, Ek J, Brøndum-Nielsen K. Oculocutaneous albinism. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2007;2:43–53. doi: 10.1186/1750-1172-2-43.
36. Summers CG. Albinism: Classification, clinical characteristics, and recent findings. *Optom. Vis. Sci.* 2009;86:659–662. doi: 10.1097/OPX.0b013e3181a5254c.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН
Новикова Юлия Петровна
кандидат биологических наук, инженер
ул. Вавилова, 26, Москва, 119334, Российская Федерация

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН
Григорян Элеонора Норайровна
доктор биологических наук, главный научный сотрудник
ул. Вавилова, 26, Москва, 119334, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0003-0865-4730>

ABOUT THE AUTHORS

N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS
Novikova Yulia P.
PhD in Biology, engineer
Vavilova str., 26, Moscow, 119334, Russian Federation

N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS
Grigoryan Eleonora N.
PhD in Biology, leading research officer
Vavilova str., 26, Moscow, 119334, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0003-0865-4730>