

Institutul de sănătate publică și cercetări medicale, Laboratorul de dinamică celulară (cond.: prof. dr. V. D. Mârza, membru al Academiei de științe medicale)
din Iași

**DINAMICA CELULARĂ ȘI HISTOARHITECTONICĂ A SINUSURILOR
MEDULARE DIN LIMFONODUL REGIONAL
ÎN CURSUL REACȚIILOR
IMUNOLOGICE LA ȘOBOLANI**

dr. Cecilia *Barbărasă*, Flora *Postică*, Mărioara *Niculescu*

Sinusurile medulare reprezintă sediul primei faze a reacțiilor imunologice din limfonod. Ele au un rol important în procesul inițial de fagocitoză și de transmitere în parenchim a materialului antigenic (5, 6) și ulterior în vehicularea limfei bogate în anticorpi și a limfocitelor, al căror rol în reacțiile imunitare este dovedit (7).

În diferite faze ale reacțiilor imunologice ale limfonodului, în afară de modificările dependente de procesul exsudativ local, conținutul sinusurilor medulare poate varia în funcție de dinamica circulației limfocitelor și de intensitatea procesului limfopoietic (1, 6, 11). Lucrări anterioare (8, 9, 10) au evidențiat participarea sistemului nervos central în reglarea proceselor de proliferare și diferențiere celulară din reacțiile imunologice ale limfonodului inghinal. În această cercetare se studiază variațiile densității celulare și ale histoarhitectonicii sinusurilor medulare ale aceluiași limfonod, pentru a vedea în ce măsură aceste modificări reflectă procesele celulare reglate de sistemul nervos central. De asemenea se urmăresc relațiile cantitative dintre celulele pluripotente nediferențiate, diferențiate și celulele mature specializate în sens macrofagic.

Lucrarea are valoare practică în special pentru histopatologi, care pot folosi aceste date în interpretarea justă a anumitor aspecte reactive ale limfoganglionilor.

Material și metodă

Cercetările s-au efectuat pe 160 șobolani (Sprague-Dowley) masculi, adulți, în greutate de 180—300 gr.

Model experimental: șobolanii au fost împărțiți în 10 loturi egale, primul lot martor, iar restul animalelor au fost imunizate prin 8 injecții de vaccin TAB (excitant necondiționat) administrat subcutan la baza cozii la interval de 2 zile (0,10 ml în 0,90 ml ser fiziologic). Inoculările au fost asociate cu imobilizarea animalelor pe stative, timp de 3 ore (excitant condiționat). Anticorpii serici au fost titrați la intervale regulate și animalele sacrificate în 9 etape, în funcție de concentrația anticorpilor în sinșele periferic. Lotul 1 reprezintă lotul martor, loturile 2a, 2b și 2c (faza 1) reprezintă loturile sacrificate în perioada de creștere a anticorpilor serici până la valori maxime; loturile 3a, 3b și 3c (faza 2) reprezintă animalele sacrificate în cursul scăderii anticorpilor serici până sub 1⁰% din valoarea maximă, iar loturile 4a, 4b și 5 (faza 3) — sacrificate în cursul reacției anamnestică obținute prin imobilizarea animalelor, fără inocularea antigenului. Limfonodul inghinal s-a fixat în lichid Carnoy, la rece, incluzie la parafină, colorație hematoxilină-eozină și verde metil-pironină. S-au efectuat secțiuni seriate, s-au ales pentru determinări secțiunile centrale, cu mărimea maximă.

Densitatea celulară s-a determinat prin numărarea elementelor în 100 câmpuri microscopice convenționale, parcurgând toată suprafața de secțiune (ocular 16X, obiectiv 100X).

S-a notat numărul total de celule și numărul din fiecare tip celular atît din lumen cît și din peretele sinusal.

În scopul determinării interrelațiilor dintre celulele reticulare nediferențiate (CRN) și celulele diferențiate în sens macrofagic s-au urmărit relațiile cantitative dintre populațiile celulare enunțate; s-au calculat aceste rapoarte.

Modificările histoarhitectonice: secțiunile au fost desenate cu ajutorul dispozitivului cu cameră clară (microscop Zeiss, ocular 10 X, obiectiv 10 X), delimitîndu-se conturul general și cel al principalelor zone: corticală, eroziune, cordoane medulare, sinusuri medulare, hil. Suprafețele

desenate au fost măsurate planimetric, iar valorile obținute au fost transformate în unități reale de suprafață, exprimate în mm². Din rezultatele absolute s-au calculat valorile relative procentuale ale suprafețelor ocupate de fiecare zonă. Din rezultatele individuale s-au efectuat medii statistice pe loturi. Diferențele s-au apreciat prin testul „t” (Student-Fischer) și probabilitatea statistică „P”.

Rezultate

Variațiile densității celulare totale și ale principalelor elemente celulare din sinusurile medulare (tabelul nr. 1).

Tabelul nr. 1

Semnificația statistică a diferențelor (p) între loturi, pentru densitatea celulară totală și elementele celulare din sinusurile medulare

Loturi compa- rate	Densitate totală	Serie limfocitară	C.R. diferențiată	C.R. macrofagică	Macrofag
1—2a		p < 0,01	p < 0,05		p = 0,05
1—2b	p = 0,05	p < 0,001	p < 0,05		p = 0,02
1—2c				p < 0,05	
2b—2c	p < 0,05	p < 0,01			p = 0,05
1—3a	p < 0,001	p < 0,01			p < 0,001
1—3b		p < 0,01		p < 0,05	
3a—3c	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,01	
3c—4a		p = 0,05	p < 0,001	p < 0,01	
3c—4b			p < 0,001	p < 0,001	
4a—4b		p < 0,05		p < 0,05	
4b—5			p < 0,01		

Se remarcă o scădere progresivă a densității celulare totale la loturile 2a și 2b față de lotul martor, care realizează în lotul 2b diferențe statistic semnificative.

În lotul 2c densitatea celulară din sinusuri crește, depășind valorile lotului martor și realizând o diferență statistic semnificativă în comparație cu lotul 2b. Densitatea celulară continuă să crească la lotul următor, unde atinge valoarea maximă, la 60 de zile după imunizare. În loturile următoare, 3b și 3c, densitatea celulară din sinusuri se reduce progresiv, revenind în lotul 3c la valorile din lotul martor. Aplicarea excitantului condiționat reproduce (lot 4a și 4b) aceeași dinamică, fără însă a atinge limita semnificației.

Densitatea particulară a elementelor din sinusuri a prezentat variații caracteristice și semnificative la nivelul populației de celule reticulare diferențiate, a elementelor celulare din seria reticulo-macrofagică și limfocitară. Populația de celule reticulare macrofagice (CRMc) manifestă o creștere moderată la lotul 2a după care scade semnificativ. Se remarcă

apoi o reacție a acestor celule care se produce la lotul 3a, urmată de o reducere foarte semnificativă la loturile examinate în perioada de pauză a procesului imunologic. Reacția apare din nou, foarte semnificativă la loturile examinate după aplicarea excitantului condiționat (lot 4a și 4b). La ultimul lot diferențierea macrofagică a celulelor reticulare din peretele sinusului se reduce semnificativ.

Populația de *celule reticulare diferențiate* (CRD) prezintă o dinamică similară, cu reacții semnificative atât după imunizare cât și după aplicarea excitantului condiționat.

În *lumenul sinusului* medular densitatea celulelor *macrofagice* crește semnificativ începând cu primul lot sacrificat după imunizare și se menține crescută și la lotul 2b. La lotul 2c, reacția macrofagică se reduce semnificativ. La lotul 3a se remarcă o nouă creștere a populației de macrofage libere din sinusuri, reproducând dinamica CRMc, apoi o reducere la lotul următor, după care variațiile sînt necaracteristice.

Densitatea *seriei limfocitare* a prezentat scăderi semnificative începînd cu lotul 2a, care s-au menținut și la lotul 2b. La 10 zile de la ultima inoculare (lotul 2c), populația limfocitară prezintă o creștere foarte marcată atîngînd valori statistice semnificative în comparație cu lotul 2b. La loturile următoare, seria limfocitară continuă să crească la lotul 3a, depășind semnificativ valorile lotului martor, aspect ce se menține și la lotul 3b. Aplicarea excitantului condiționat, determină din nou o scădere a seriei limfocitare, care apare foarte precoce (4a) urmată imediat de o nouă creștere.

În cadrul interrelațiilor celulare, în peretele sinusal medular, s-a urmărit filiația seriei macrofagice din CRN. Creșterea progresivă a valorilor raportului dintre aceste două elemente (tabelul nr. 2) indică în faza 1 a procesului imunologic diferențierea CRN în sens histiomacrofagic, proces ce se repetă și în faza 2 și mai slab în faza 3.

Analiza corelației dintre procesele de diferențiere histiomacrofagică și dinamica anticorpilor serici a arătat o concordanță exprimată prin creșterile intense din faza 1 și mai moderate în faza 3.

Tabelul nr. 2

Dinamica celulelor nediferențiate și diferențiate în sinusurile medulare și rapoartele stabilite între ele în cursul celor trei faze imunologice

Faza	Lot	CRN	CRD	CRMc+Mfg	CRMc+ CRD+Mfg/CRN
1	1	205	17	696	3,48
	2a	125	19	785	6,43
	2b	103	20	757	7,54
	2c	123	14	644	5,35
	3a	141	14	1011	7,27
2	3b	81	6	695	8,65
	3c	116	4	868	7,52
	4a	116	15	919	8,05
3	4b	98	14	848	8,79
	5	114	6	897	7,92

Am urmărit apoi *modificările histoarhitectonice* (tabelul nr. 3) din zona medulară: rolul cordoanelor și sinusurilor în variațiile suprafeței relative ocupate de acestea în cadrul suprafeței totale medulare. Se poate constata că la animalele martor suprafața sinusurilor și suprafața cordoanelor ocupă, în medulară, întinderi apropiate ca mărime, cu ușoară superioritate a cordoanelor. La loturile de animale supuse imunizării raportul se deplasează progresiv în favoarea cordoanelor, în timp ce suprafața ocupată de sinusuri scade semnificativ. Acest raport caracterizează loturile 2b și 2c, în care dezvoltarea cordoanelor medulare atinge valorile maxime. În loturile examinate în perioada de pauză, 3a, 3b și 3c, se constată o revenire treptată a suprafeței sinusurilor către valorile din lotul martor, modificând din nou raportul dintre aceste două componente ale zonei medulare. În lotul 3b scăderea marcată a suprafeței cordoanelor medulare determină o inversare a raportului, cu o ușoară predominanță a valorilor sinusale. În continuare, la lotul 3c, se constată o creștere moderată a cordoanelor, care restabilește raporturi procentuale similare cu acelea găsite la lotul martor. Aplicarea excitantului condiționat determină o dinamică similară cu aceea constatată după imunizare, modificând din nou raportul în favoarea cordoanelor.

Tabelul nr. 3

Semnificația statistică a diferențelor (p) între loturi, pentru suprafața zonei medulare și a componentelor sale

Loturi comparate	Valori absolute Suprafața totală a zonei medulare	Valori procentuale		
		Cordon	Sinus	Hil
1—2a	$0,1 > p > 0,05$			
1—2b	$p < 0,001$	$0,1 > p > 0,05$	$p = 0,05$	
1—2c	$p < 0,01$		$p < 0,01$	
2b—2c				$p < 0,05$
2b—3a	$p = 0,01$			
2b—3b	$p = 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,02$	$p < 0,001$
2b—3c	$p < 0,001$			
3b—3c		$p < 0,001$		$p < 0,01$
3c—4a	$p < 0,05$		$p < 0,02$	
3c—4b	$p = 0,02$			
3c—5	$p < 0,01$			

În variațiile histoarhitectonice ale zonei medulare se mai remarcă variațiile suprafeței ocupate de regiunea hilului și scleroză. Regiunea hilului prezintă o suprafață redusă și constantă în primele trei loturi, crește semnificativ în lotul 2c, se menține la aceleași valori crescute în loturile 3a și 3b, pentru a reveni la valorile normale în lotul 3c; în următoarele loturi prezintă variații necaracteristice. Variațiile suprafeței totale a zonei medulare și variațiile raportului procentual dintre componentele acesteia, ne arată că factorul principal care determină modificări în histoarhitectura zonei medulare este constituit de intensitatea proceselor de creștere și regresivitate a cordoanelor medulare.

Mai semnalăm că există concordanță între dinamica suprafeței zonei medulare și aceea a anticorpilor serici, ceea ce demonstrează participarea limfonodului regional în ambele reacții imunologice.

Discuții

Rezultatele expuse au evidențiat modificări caracteristice ale densității și componenței celulare ale sinusurilor medulare precum și variații histoarhitectonice continue în decursul evoluției procesului imunogenetic. Majoritatea acestor modificări au fost relatate de numeroși autori și de noi în lucrări anterioare, de aceea vom discuta numai datele mai deosebite care s-au evidențiat prin determinările cantitative și biometrice.

Densitatea celulară a sinusurilor este dependentă de elementul celular predominant, care în condiții fiziologice normale este limfocitul mic. Scăderea limfocitelor din sinusuri, una dintre modificările cele mai precoce în reacțiile de imunitate, a fost observată și de Ehrlich (1956), *La Via* (1960), Marshall (1956), confirmată indirect prin numărători ale elementelor limfoide în limfa eferentă (2, 12). În experiența noastră scăderea limfocitelor este independentă de extinderea suprafeței sinusale. S-a evidențiat de asemenea creșterea compensatorie și de lungă durată a limfocitelor sinusale, descrisă și de alți autori și care este considerată de Ehrlich, Marshall, Yoffey, *La Via*, expresia intensificării limfopoiezei corticale și de alți autori (3) expresia intensificării recirculației limfocitare. În ce privește dinamica celulară a seriei reticulo-macrofagice rezultatele noastre au evidențiat reacțiile caracteristice cunoscute. Urmărirea proceselor de reacție sinusală la intervale de timp mai apropiate decât în cercetările anterioare ne-a permis însă să deosebim o reacție de mobilizare mai rapidă a celei reticulare macrofagice în reacția la antigen deși procesele de diferențiere reticulo-macrofagică sînt de aceeași intensitate și în reacția obținută prin aplicarea excitantului condiționat. Este confirmată și de noi reactivitatea zonei medulare prin faptul că în sinusurile medulare am decelat clar diferențierea în sens macrofagic a CRN în ambele răspunsuri imunologice.

Studiul histoarhitectoniei limfonodului inghinal descris într-o lucrare anterioară (9) ne-a permis să determinăm obiectiv variațiile caracteristice fiecărei zone în diferitele etape ale procesului imunogenetic și reperкусиunea acestor variații asupra aspectului histoarhitectonic general.

Unele din modificările mai caracteristice au fost semnalate și de alți autori, fiind apreciate prin examen microscopic simplu. Astfel, Ehrlich semnalează devierea raportului în favoarea zonei medulare în primele zile ale procesului imunologic.

În cadrul zonei medulare modificările histoarhitectonice sînt condiționate de procesele de creștere și regresivitate a cordoanelor medulare determinînd, privitor la raportul cordon-sinus, o dinamică similară cu aceea a raportului corticală-medulară (9).

Concluzii

Din rezultatele noastre în privința filiației populației macrofagice reținem în faza 1 diferențierea CRN în sens macrofagic, reflectată în creșterea populației mature. Tendința de menținere a valorilor acestui

raport în faza 2 poate sugera că există o rezervă celulară blastică sensibilizată în stadii variabile de diferențiere. Aceasta poate asigura în faza 3, paralel cu procesul de diferențiere din CRN, răspunsul anamnestic.

Rezultatele obținute în această lucrare arată existența unei corelații nete între procesele celulare de proliferare și variațiile histoarhitectonice din sinusurile medulare ale limfonodului inghinal și curba anticorpilor serici. Această corelație se manifestă de asemenea în cursul reacției anamnestică la excitant condiționat ceea ce confirmă rolul regulator al sistemului nervos central în reacțiile imunologice.

Recunoașterea diferitelor tipuri celulare s-a făcut după Maximov 1927, Bloom și Fawcett 1965, Humphrey 1970.

S-a considerat:

Celulă reticulară nediferențiată = celula reticulară primitivă a autorilor citați, legată de stroma fibrilară a țesutului limfoid, adesea fără limite celulare. Aspectul obișnuit al CRN: nucleu oval, fusiform, adesea turtit, palid — sărac în cromatină —, cu un nucleol mic colțuros. Citoplasma este redusă, omogenă și de asemenea palidă.

Celulă reticulară diferențiată = celula reticulară activată a aceluiași autori, cu aspect turgescenț al citoplasmei și nucleului. Ea prezintă un corp celular mare, clar, sferic, citoplasma ușor bazofilă, cu un nucleu mare, rotunjit, leptocromatic și nucleoli mici bazofili.

Celulă reticulară macrofagică = macrofag fix = celula reticulară fagocitară este de fapt tot o celulă reticulară activată cu localizare mai ales în sinus și peretele acestuia. De obicei are formă stelată sau fusiformă și aderă la fibrele reticulare. Nucleul se mărește, este palid și membrana sa formează falduri neregulate care adesea se insinuează adânc în interior. Citoplasma este mai abundentă, se colorează mai întunecat și are un aspect mai mult sau mai puțin granular. Se remarcă apariția de diferite incluzii.

În anumite condiții această celulă se mobilizează devenind *macrofag* = element complet mobilizat, liber, mare, cu capacitate coloidopexică și fagocitară. Ea se desprinde de pe reticul, prelungirile fixe sînt retractate, iar celula reticulară se transformă într-un corp celular mare, sferic, formator de pseudopode. Nucleul ia poziție net excentrică, devine reniform, cutat. Deși membrana nucleară se îngroașă, nucleul rămîne totuși palid, veziculos — caracteristică importantă pentru diferențierea sa de formele de trecere ale limfocitelor. Nucleolul este mărit dar nu atinge talia și colorabilitatea din limfoblaști. Citoplasma este palidă, net acidofilă, cu vacuole mai mari sau mai mici și diferite incluzii.

Sosit la redacție: 13 iunie 1972.

Bibliografie

1. Ehrich W.: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Springer, Berlin, 1956, VII/1, 170; 2. Ehrich W., Harris T.: J. Exp. Med. (1942), 76, 335; 3. Fichtelius K., Juhani Linna: Control of Cellular Growth in Adult Organisms, Academic Press, Londra, New York, 1967, 171; 4. La Via M., Fitch F., Gunderson Ch., Wissler R.: Reticuloendothelial Structure and Function, Ronald Press, New York, 1960, 45; 5. Lennert K.: Handbuch der spe-

ziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Springer, Berlin, 1961, I/III, 1; 6. *Marshall A.*: An Outline of the Cytology and Pathology of the Reticular Tissue, Oliver and Boyd, London, 1956; 7. *McGregor D., Gowans J.*: J. Exp. Med. (1963), 117, 2, 303; 8. *Niculescu M., Barbărasă C.*: Rev. roum. embryol. cytol., sér. Cytol. (1967), 2, 99; 9. *Niculescu M., Barbărasă C., Gavază F., Guțu S.*: Rev. roum. embryol. cytol., sér. Cytol. (1968), 1, 29; 10. *Niculescu M., Barbărasă C., Mârza L., Gavază F.*: Rev. roum. embryol. cytol., sér. Cytol. (1969), 2, 93; 11. *Thorbecke G., Jacobson E., Hochwald G.*: Symp-Molecular and Cellular Basis of Antibody Formation, Academic Press, New York, 1965, 587; 12. *Yoffey J.*: Quantitative Cellular Haematology, Ch. Thomas, Springfield, 1960, 3.
