

МОРФОЛОГІЯ

УДК 636.92:591.441

Дунаєвська О. Ф.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ

СЕЛЕЗІНКИ КРОЛІВ

Житомирський національний агрономічний університет (м. Житомир)

Oksana_Fd@ukr.net

Виконане дослідження є частиною наукової тематики кафедри анатомії і гістології факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агрономічного університету «Розвиток, морфологія та гістохімія органів тварин у нормі та при патології», № державної реєстрації 0113V000900.

Вступ. Селезінка – багатофункціональний непарний орган, розташований у черевній порожнині. Це важливий орган лімфоцитоутворення та імунітету, в якому під впливом антигенів, наявних у крові, відбувається утворення клітин, які продукують гуморальні антитіла чи ті, що беруть участь у реакціях клітинного імунітету й є біологічним фільтром артеріальної крові. У ній фагоцитуються старі та пошкоджені еритроцити й тромбоцити, що завершили свій життєвий цикл. Доведено, що основна її функція – нейтралізація у крові патогенних мікроорганізмів, токсинів, загиблих еритроцитів, пігментів і електронегативних колоїдів [5].

Використання сучасних досягнень гісто- та цитоімуногістохімії із застосуванням моноклональних антитіл та імуноферментного аналізу дало змогу виявити на поверхні лімфоцитів та інших імунокомпетентних клітин специфічні рецептори, що можуть слугувати маркерами різних субпопуляції клітин [5]. І стало можливим імунотипування лімфоцитів у нормі та за патологічних станів організму [1,2], вивчення впливу на популяції різних чинників [7,10]. Встановлено, що в Т-залежній зоні селезінки (періартеріальні лімфоїдні піхви (ПАЛП) переважають лімфоцити популяції CD3+ і CD4+, в незначній кількості виявляються CD8+, наявні також макрофаги, ретикулярні клітини. У зовнішніх відділах таких піхв більш поліморфний склад, присутні популяції В-лімфоцитів. Світлий центр лімфоїдного вузлика є Т-незалежною зоною, тут розміщуються основні три типи клітин: В-лімфобласти, які діляться; дендритні клітини, які фіксують антиген і зберігають його протягом тривалого часу та вільні макрофаги. Крім В-лімфоїдних елементів міститься невелика кількість Т-лімфоцитів, серед яких переважають CD4+, в меншій кількості є CD8+ клітини. Мантійна зона лімфоїдного вузлика, як і світлий центр, відноситься до тимуснезалежної зони. В ній відбувається кооперативна взаємодія Т- і В-лімфоцитів, що зумовлює різноманітний популяційний склад лімфоцитів [5,6]. Серед популяції CD8+ Т-лімфоцитів важливими є клітини пам'яті [8]. Т-лімфоцити з кластерами CD8+ зустрічаються не тільки в білій, а й у червоній пульпі селезінки [9]. Імуногістохімічні дослідження прово-

дяться, як правило, в гуманній медицині і починають впроваджуватись для продуктивних тварин.

Мета дослідження. З'ясувати особливості морфофункционального стану селезінки кролів на основі визначення вмісту, розміщення і кількісного співвідношення субпопуляцій лімфоцитів CD4+, CD8+, CD19+, CD20+, які будуть доповнювати морфометричні тест-критерії органу та виступатимуть чутливими маркерами впливу факторів різноманітного ґенезу.

Об'єкт і методи дослідження. Для дослідження здійснювали відбір селезінки в стадії морфофункциональної зрілості у клінічно здорових статевозрілих кролів каліфорнійської породи (6-8 місяців, кількість 34) обох статей у співвідношенні 1:1. Для мікроскопічних досліджень шматочки матеріалу фіксували в 10-12%-му охолодженню розчині нейтрального формаліну, здійснювали парафінізацію. Гістологічні зрізи виготовляли на санному мікротомі MC-2 товщиною не більше 5 мкм. Для виявлення та вивчення субпопуляцій лімфоцитів при світловій мікроскопії використовували мишні моноклональні антитіла датської фірми DAKO, експресуючі антигенні маркери CD4+ (T-хелпери), CD8+(T-цитотоксичні клітини і нормальні T-кілери), CD19+ (В-лімфоцити ранніх етапів розвитку), CD20+ (В-лімфоцити на стадії диференціації). Визначали розміщення та вміст (абсолютну і відносну кількість) і кількісне співвідношення популяцій. Імунорегуляторний індекс (IPI) визначали як відношення кількості клітин CD4+ до клітин CD8+. Методики, статистична обробка результатів використовувались відповідно до описаних в посібнику Горальського Л.П. зі співавторами (2005) [3]. Морфометричні дослідження здійснювали за допомогою програми «Master of Morphology».

Уся експериментальна частина дослідження була проведена згідно з вимогами міжнародних принципів «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986 р.) та відповідного Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3446-IV від 21.02.2006 р., м. Київ).

Результати досліджень та їх обговорення. За нашими попередніми дослідженнями встановлено, що селезінка кролів відноситься до захисного типу, відносна площа білої пульпи становила $17,68 \pm 4,40\%$ [4]. Лімфоїдним вузликам (ЛВ) належало 67,59 % білої пульпи, решта – періартеріальним лімфоїдним піхвам. В складі лімфоїдних вузлів чітко виділялась періартеріальна зона навколо центральної артерії, світлий центр, мантійна і маргінальна зони. У струк-

МОРФОЛОГІЯ

турі цих вузликів найбільшого розвитку мала маргінальна зона, частка якої становила $38,85 \pm 11,98\%$, найменшого – світлий центр ($17,37 \pm 6,01\%$). Червона пульпа займала $76,45 \pm 3,78\%$ маси селезінки. Імуно-компетентна функція селезінки визначається саме її лімфоїдною тканиною (білою пульпою). Основними клітинами є лімфоцити. За морфологічною будовою і розмірами Т-лімфоцити кролів відповідають малим формам лімфоцитів. Зрілі лімфоцити досягали $6,2 - 6,4 \text{ мкм}$ і мали переважно округле, рідше – бобоподібне ядро та вузьку цитоплазму. В-лімфоцити дещо більші за розмірами – $8,3 - 8,5 \text{ мкм}$, за своєю величиною близькі до середніх лімфоцитів. Субпопуляції лімфоцитів з кластерами CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ в пульпі селезінки розміщувались поодиноко (рис. 1) та дифузно (рис. 2), частіше утворювали ланцюги (рис. 3) або скupчення (рис. 4).

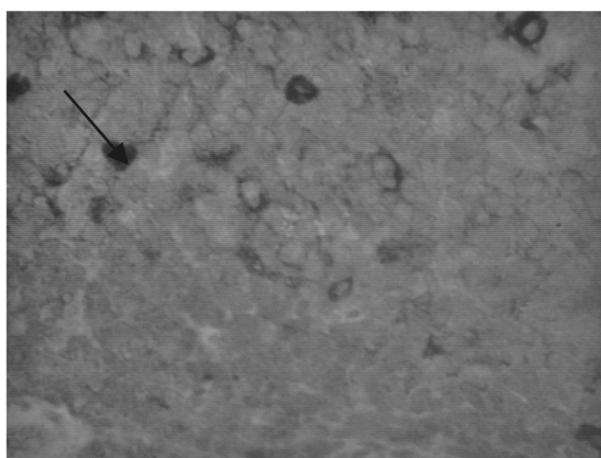


Рис. 1. СД4+-лімфоцити у червоній пульпі селезінки кролів. $\times 400$.

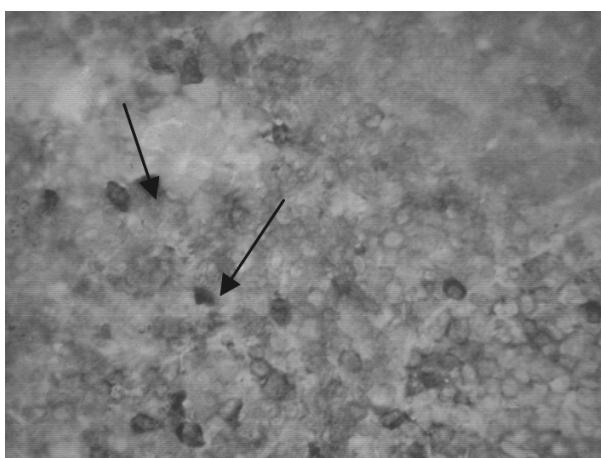


Рис. 2. СД8+-лімфоцити у періартеріальних лімфоїдних піхвах селезінки кролів. $\times 400$.

Кількість СД4+ в ПАЛП становила $20,25\%$ від загальної кількості популяції білої пульпи, решта ($79,75\%$) розташовувалась в ЛВ. В світловому центрі ЛВ їх кількість склада $45,29 \pm 13,34$ шт. на умовну одиницю площини (шт. на ум. од. пл.), в мантійній зоні – $34,14 \pm 9,96$ шт. на ум. од. пл., що становило $24,61\%$ і $75,39\%$ відповідно. Клітин СД8+ в ПАЛП нараховува-

лась $8,6 \pm 4,18$ шт. на ум. од. пл. ($13,99\%$ від загальної кількості популяції в білій пульпі), в ЛВ – $52,86 \pm 19,02$ шт. на ум. од. пл. В мантійній зоні ЛВ дана популяція переважала у порівнянні з світлим центром ЛВ у 1,8 разів ($21,00 \pm 8,94$ шт. на ум. од. пл. і $37,80 \pm 14,88$ шт. на ум. од. пл. відповідно). IPI ПАЛП становив більше 1 (1,34) та менше 1 у білій пульпі (0,92), найменший IPI світлого центру (0,53), у мантійній зоні цей індекс дорівнював 0,90.

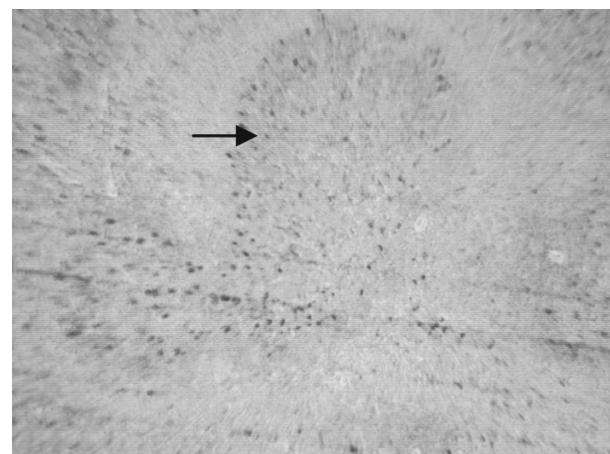


Рис. 3. СД19+-лімфоцити мантійної зони лімфоїдного вузлика селезінки кролів. $\times 80$.

Серед популяцій В-лімфоцитів на $0,7\%$ переважали СД19+ – лімфоцити у порівнянні з СД20+. Найбільша їх кількість знаходилась в мантійній зоні ($37,83 \pm 9,80$ і $37,29 \pm 4,40$ шт. на ум. од. пл. відповідно), найменша в ПАЛП ($14,87 \pm 4,79$ і $13,20 \pm 3,49$ шт. на ум. од. пл. відповідно). В періартеріальних зонах їх кількість достовірно зросла до $8,50 \pm 1,12$ і $11,75 \pm 1,48$ шт. на ум. од. пл. ($P > 0,95$). В світловому центрі кількість СД19+ становила $32,64\%$ від загальної кількості популяції ЛВ білої пульпи, їх кількість нараховувала $18,33 \pm 2,36$ шт. на ум. од. пл. В світловому центрі кількість СД20+ була більшою приблизно на 2% і становила $34,75\%$ від загальної кількості популяції ЛВ білої пульпи, їх кількість нараховувала $19,85 \pm 3,59$ шт. на ум. од. пл. Така невелика різниця

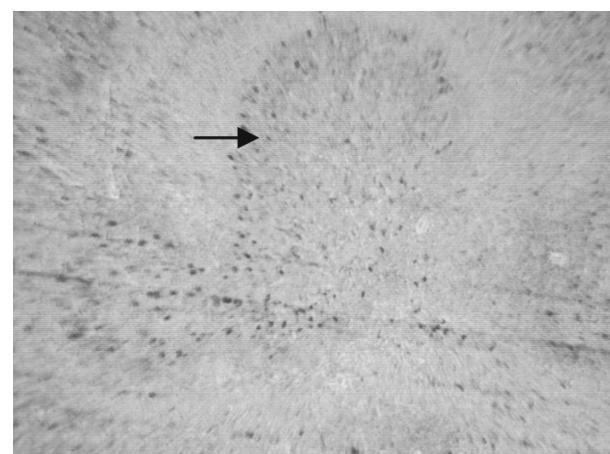


Рис. 4. СД20+-лімфоцити періартеріальної зони лімфоїдного вузлика селезінки кролів. $\times 80$.

МОРФОЛОГІЯ

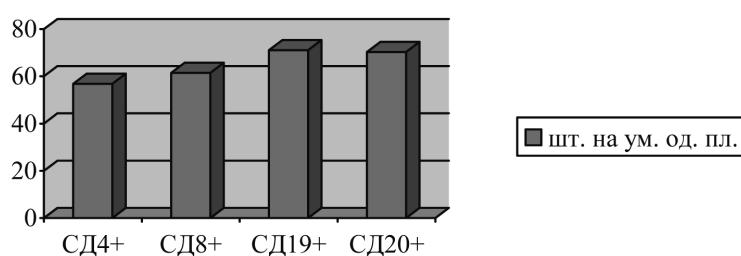


Рис. 5. Субпопуляції лімфоцитів білої пульпи селезінки кролів у кількісному вимірюванні.

пояснюється тим, що СД19+-лімфоцити знаходяться на самих ранніх етапах розвитку лінії, а СД20+-лімфоцити на стадіях диференціації В-клітин.

Кількісний аналіз субпопуляцій лімфоцитів білої пульпи селезінки кролів (**рис. 5**) свідчить, що серед досліджуваних Т-лімфоцитів СД8+. Це пояснюється отриманими результатами при досліженні кластерів селезінки мишей [6]: СД8+ можуть додатково експресуватися на дендритних клітинах. Значний вміст В-клітин пояснюється особливістю первинної імунної відповіді і наявністю у значній кількості розчинних форм антигенів, які найбільше презентативні саме цим популяціям [6]. Кількість субпопуляцій прямо пропорційно залежить від відносної площини структурної одиниці білої пульпи: світлий центр займає найменшу відносну площину, відповідно, кількість субпопуляцій найменша.

Висновки

1. Вивчення імуногістохімічних популяцій лімфоцитів CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ засвідчило, що

они розташовувались поодиноко в червоній пульпі, утворювали ланцюги і скучення в білій пульпі.

2. Кількість СД4+ клітин в періартеріальних лімфоїдних піхвах становила 20,25 % від загальної кількості популяції білої пульпи. В лімфоїдному вузлику 75,39 % кластера знаходилось в мантійній зоні.

3. В мантійній зоні популяція СД8+ переважала у порівнянні з світлим центром у 1,8 разів, в лімфоїдних вузликах

– у 6,15 разів відносно періартеріальних лімфоїдних піхв. Імунорегуляторний індекс періартеріальних лімфоїдних піхв становив 1,34, білої пульпи 0,92, світлого центру 0,53, мантійної зони 0,90.

4. Серед популяцій В-лімфоцитів незначно переважали СД19+. Найбільша їх кількість знаходилась в мантійній зоні, найменша в періартеріальних лімфоїдних піхвах. В періартеріальних зонах лімфоїдних вузликах їх кількість зросла з поодиноких клітин до $8,50 \pm 1,12$ і $11,75 \pm 1,48$ шт. на ум. од. пл. (СД19+ і СД20+ відповідно). В маргінальній зоні зустрічались всі субпопуляції у майже однакових кількостях, що зумовлено функцією кооперативної взаємодії Т- і В-лімфоцитів.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження плануємо спрямовувати на вивчення інших субпопуляцій лімфоцитів селезінки у кролів з врахуванням різних вікових груп.

Література

1. Vpliv plazmaferezu na deyaki imunologichni pokazniki u zhinok z bezpliddyyam trubnogo pohodzhennya / O.V. Bakun, O.A. Andriets, M.G. Oliynik [ta.in.] // Visnik VDNZU «Ukrainska medichna stomatologichna akademiya». – 2012. – T. 12. – Vip. 3(39). – S. 116-118.
2. Gladkih A.A. Ekspressiya tsiklinov fazyi S1 v V-zrelokletochnyih limfomah cheloveka: avtoref. diss. na soiskanie nauch. stepenya k. b. nauk: spets. 03.03.04 «Kletochnaya biologiya, tsitobiologiya, gistolohiya» / A.A. Gladkih. – M., 2013. – 26 s.
3. Goralskiy L.P. Osnovi histologichnoi tekhniki i morfofunktionalni metodi doslidzhen u normi ta pri patologiyi: navch. posibnik / L.P. Goralskiy, V.T. Homich, O.I. Kononskiy. — Zhitomir: Polissya, 2005. — 288 s.
4. Dunaievskaya O.F. Osoblivosti morfolohiyi selezinki kroliw / O.F. Dunaievskaya // Visnik Problem biologiyi i meditsini. – Poltava, 2016. – Vip. 1. – T. 1 (126). – S. 80-83.
5. Panikar I.I. Morfogenet organiv imunnayi sistemi svyiskoyi svini na rannih etapah postnatalnogo periodu ontogenezu: avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stupenyu d. vet. nauk: spets. 16.00.02 "Patologiya, onkologiya i morfolohiya tvarin" / I.I. Panikar. – K., 2015. – 42 s.
6. Fedorovskaya N.S. Immunomorfologicheskaya harakteristika selezyonki pri tsitopeniyah immunnogo genezisa / N.S. Fedorovskaya, D.A. Dyakonov. – Kirov: Avers, 2013. – 101 s.
7. Acute arsenic exposure induces inflammatory responses and CD4+Tcell subpopulations differentiation in spleen and thymus with the involvement of MAPK, NF-кB, and Nrf2 / X. Duan, S. Gao, J. Li [et al.] // Molecular Immunology. – 2017. – № 81. – P. 160-172.
8. Immune signatures of protective spleen memory CD8 T cells / L. Brinza, S. Djebali, M. Tomkowiak [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – DOI: 10.1038/srep37651.
9. Local Cellular and Cytokine Cues in the Spleen Regulate In Situ T Cell Receptor Affinity, Function, and Fate of CD8+ T Cells / Y.-J. Seo, P. Jothikumar, M.S. Suthar [et al.] // Immunity. – 2016. – № 45. – P. 988-998. – Режим доступу до журн.: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jimmuni.2016.10.024>.
10. Spleen Tyrosine Kinase Is Involved in the CD38 Signal Transduction Pathway in Chronic Lymphocytic Leukemia / M.B.-Petersen, M. Buchner, Arlette Dorffel [et al.] // Plos One. – 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0169159.

УДК 636.92:591.441

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ СЕЛЕЗІНКИ КРОЛІВ

Дунаєвська О. Ф.

Резюме. Представлені результати імуногістохімічної характеристики субпопуляцій лімфоцитів білої пульпи селезінки статевозрілих кролів каліфорнійської породи віком 6-8-ми місяців. З'ясовано розміщення, кількісний вміст субпопуляцій лімфоцитів CD4+, CD8+, CD19+, CD20+, вираховано імунорегуляторний індекс.

МОРФОЛОГІЯ

Встановлено, що лімфоцити CD4+, CD8+ більше зосереджувалися в мантійній зоні, ніж у світловому центрі лімфоїдного вузлика. Імунорегуляторний індекс періартеріальних лімфоїдних піхв становив 1,34, білої пульпи 0,92. Серед популяцій В-лімфоцитів незначно переважали Сd 19+. Найбільша їх кількість знаходилась в мантійній зоні, найменша в періартеріальних лімфоїдних піхвах. В маргінальній зоні наявні всі субпопуляції.

Ключові слова: селезінка, морфологія, імуногістохімічна характеристика, кролі, біла пульпа, субпопуляції лімфоцитів CD4+, CD8+, CD19+, CD20+, лімфоїдний вузлик.

УДК 636.92:591.441

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЁНКИ КРОЛИКОВ

Дунаєвська О. Ф.

Резюме. Представлены результаты иммуногистохимической характеристики субпопуляций лимфоцитов белой пульпы селезёнки половозрелых кроликов калифорнийской породы возрастом 6-8-ми месяцев. Выяснено размещение, количественное содержание субпопуляций лимфоцитов CD4+, CD8+, CD19+, CD20+, рассчитан иммунорегуляторный индекс. Установлено, что лимфоциты Cd4+, Cd8+ больше сосредоточивались в мантийной зоне, чем в светлом центре лимфоидного фолликула. Имунорегуляторный индекс перифартериальных лимфоидных муфт составлял 1,34, белой пульпы 0,92. Среди популяций В-лимфоцитов незначительно преобладали Сd 19+. Наибольшее их количество находилось в мантийной зоне, наименьшее в перифартериальных лимфоидных муфтах. В маргинальной зоне имеются все субпопуляции.

Ключевые слова: селезенка, морфология, иммуногистохимическая характеристика, кролики, белая пульпа, субпопуляции лимфоцитов CD4+, CD8+, CD19+, CD20+, лимфоидный фолликул.

UDC 636.92:591.441

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SUBPOPULATIONS OF SPLENIC LYMPHOCYTES IN RABBITS

Dunaievska O. F.

Abstract. The modern achievements of histo - and cytoimmunohistochemistry with the monoclonal antibodies and enzyme-linked immunosorbent assay are allowed detecting on the surface of lymphocytes and other immunocompetent cells the specific receptors that can serve as markers of various subpopulations of cells. Such immunohistochemical studies should be carried out under pathological conditions, primarily, disorders of the immune system, study the effects on populations of different factors. This is especially important to implement for productive of farm animals with the aim of obtaining the safe food.

Object and methods. For research were conducted selections of mature spleen calififornia breed rabbits (6-8 mons) of both sexes (ratio female: male was 1:1).

For histological studies pieces of material recorded in the 10-12% refrigerated neutral formalin solution, with subsequent filling in paraffin. Paraffin sections were made at sledge microtome MC-2, with a thickness less than 5 microns. To identify and study subpopulations of lymphocytes by light microscopy are used murine monoclonal antibodies from Danish company DAKO, expressing antigenic markers CD4+, CD8+, CD19+, CD20+. The placement, content (absolute and relative quantity) and proportion of populations were determined. The immunoregulatory index was determined as the ratio of CD4+ cells to CD8+ cells.

Research results. The subpopulations of cells with CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ in the splenic pulp was placed solitary and diffuses, often formed of a chain or cluster.

The number of CD4+ in lymphoid sheaths near the vessels made up of 20,25 % of the total number of populations of the white pulp, and the rest (79,75 %) were located in pieces per unit area. The bright center of the lymphoid nodule number was $45,29 \pm 13,34$ pieces per unit area, in mantle zone – $34,14 \pm 9,96$ pieces per unit area which amounted to 24,61 % and 75,39 %, respectively. The cells with CD8+ in lymphoid sheaths near the vessels were $8,6 \pm 4,18$ pieces per unit area (13,99 % of the total number of population in the white pulp), in lymphoid nodule – $52,86 \pm 19,02$ pieces per unit area. In the mantle zone of lymphoid nodule this population was predominant to compared to the bright center of lymphoid nodule in 1,8 times ($21,00 \pm 8,94$ and $37,80 \pm 14,88$ pieces per unit area respectively). The immunoregulatory index of the lymphoid sheaths near the vessels was > 1 (1,34), < 1 in the white pulp (0,92), the lowest immunoregulatory index in the light center (0,53), in the mantle zone this index was equal to 0,90.

The light center number of CD19+ made up 32,64 % of the total population of the lymphoid nodule in the white pulp, their number is totaled $18,33 \pm 2,36$ pieces per unit area. In the light center number of CD 20+ was increased by approximately 2 % and accounted for 34,75 % of the total population of the lymphoid nodule in white pulp, their number have consisted of $19,85 \pm 3,59$ pieces per unit area. Such a small difference is because CD 19+cells are at a very early stage of development; the CD 20+cells are at the stages of differentiation of b-cells.

Quantitative analysis of subpopulations of lymphocytes of the splenic white pulp of rabbits is indicated that among the studied T-cells is dominated the CD8+. This is due to the results which obtained in the study of mice. The CD8+ cells can additionally expressive also in dendritic cells. A significant content of B-cells is explained to the feature of the primary immune response and the presence of considerable amount of soluble antigens which the most appealing these populations.

Keywords: spleen, morphology, immunohistochemical characteristics, rabbits, white pulp, cells subpopulations CD4+, CD8+, CD19+, CD20+, lymphoid nodule.

Рецензент – проф. Білаш С. М.

Стаття надійшла 15.06.2017 року