

УДК 612.017:578.76:615.361.018.5.013.8.014.41

В.В. Волина*, Е.В. Бровко, Е.С. Онасенко, В.Л. Пономарева

Инфицирование животных вирусом гриппа после предварительного введения препарата “Криоцелл-гемокорд”.

Сообщение II. Изучение морфофункционального состояния иммунокомпетентных органов мышей

UDC 612.017:578.76:615.361.018.5.013.8.014.41

V.V. VOLINA*, Ye.V. BROVKO, Ye.S. ONASENKO, V.L. PONOMAREVA

Infection of Animals With the Influenza Virus After a Preliminary Administration of the Preparation “Cryocell-Haemocord”.

Report II. Investigation of Morpho-Functional State of Murine Immunocompetent Organs

Изучено влияние предварительного введения препарата “Криоцелл-гемокорд” на морфофункциональное состояние легких, тимуса, лимфатических узлов и селезенки животных, инфицированных вирусом гриппа А/Виктория в летальной дозе. Полученные данные свидетельствуют о противовирусном действии препарата “Криоцелл-гемокорд”, выражающемся в отсутствии дистрофических и некротических нарушений, сохранении клеточных структур в органах иммунологической защиты и легких животных, инфицированных вирусом гриппа.

Ключевые слова: мыши, тимус, лимфатические узлы, селезенка, легкие, инфицирование вирусом гриппа, противовирусное действие препарата “Криоцелл-гемокорд”, морфологические исследования.

Вивчено вплив попереднього введення препарату “Криоцелл-гемокорд” на морфофункціональний стан легень, тимуса, лімфатичних вузлів і селезінки тварин, які були інфіковані вірусом грипу А/Вікторія в летальній дозі. Отримані дані свідчать про протівірусну дію препарату “Криоцелл-гемокорд”, яка виявляється у відсутності дистрофічних і некротичних порушень, збереженні клітинних структур в органах імунологічного захисту та легенях тварин, які були інфіковані вірусом грипу.

Ключові слова: миші, тимус, лімфатичні вузли, селезінка, легені, інфікування вірусом грипу, протівірусна дія препарату “Криоцелл-гемокорд”, морфологічні дослідження.

The influence of a preliminary administration of the preparation “Cryocell-Haemocord” on morpho-functional state of lungs, thymus, lymph nodes and spleen of animals infected with a lethal dose of the influenza virus A/Victoria was studied. The data obtained attest to an anti-virus activity of the preparation “Cryocell-Haemocord”, which manifested itself as absence of dystrophic and necrotic injuries, maintenance of cell structures in organs of immune protection and lungs of animals infected with the influenza virus.

Key words: mice, thymus, lymph nodes, spleen, lungs, the influenza virus infection, anti-virus activity of the preparation “Cryocell-Haemocord”, morphological studies.

В настоящее время грипп является наиболее распространенным инфекционным заболеванием, которое регистрируется на всех континентах. Грипп остается неконтролируемой и малоуправляемой инфекцией вследствие отсутствия действенной системы его профилактики. Непрерывная изменчивость вируса гриппа резко снижает результаты вакцинопрофилактики. Кроме того, из-за высокой скорости распространения и огромных масштабов гриппозных эпидемий не всегда удается своевременно организовать массовые прививки. Традиционная интерференопрофилактика и введение имму-

At present the influenza is the most widely-spread infectious disease, which is registered on all the continents. The influenza remains an uncontrollable and badly regulated infection since there are no efficient preventive measures for it. Continuous variability of the influenza virus depreciates results of vaccine prophylaxis. Besides, large scale vaccination cannot be always organised in time because of high rates of extension and enormous scopes of the influenza epidemics. The traditional interferon prophylaxis and immunoglobulins administration do not provide a reliable protection against virus infections either [2].

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38
(057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23,
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373
3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ноглобулинов также не обеспечивают надежной защиты от заболеваний вирусными инфекциями [2].

При развитии вирусной инфекции большое значение имеет исходное состояние иммунной системы организма. В частности, немаловажную роль в обеспечении противовирусной защиты играют Т-лимфоциты, которые являются основными факторами ликвидации вирусинфицированных клеток. В формировании цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов участвуют центральный (тимус) и периферические органы иммунологической защиты (селезенка и лимфатические узлы), от состояния которых зависит развивающийся в организме противовирусный иммунитет [1]. При тяжелом течении гриппа происходит угнетение иммунной системы, что может привести к развитию серьезных осложнений, в частности к первичной вирусной геморрагической пневмонии, которая характеризуется высокой смертностью [2].

При изучении свойств разработанного в ИПКиК НАН Украины препарата "Криоцелл-гемокорд", который представляет собой криоконсервированную суспензию ядросодержащих клеток кордовой крови человека, взвешенных в аутологичной плазме [7], показано его профилактическое действие по отношению к вирусам гриппа. В частности, заражение мышей летальной дозой вируса гриппа А/Виктория после предварительного введения препарата не вызывало их гибели [3, 6]. Возможно, что протективные свойства препарата "Криоцелл-гемокорд" связаны с воздействием на органы иммунной системы, так как в его состав входят цитокины, гормоны, витамины и микроэлементы в физиологически сбалансированном соотношении [4, 8].

Цель работы – изучение морфофункционального состояния органов иммунологической защиты (тимуса, лимфатических узлов и селезенки), а также легких животных, инфицированных вирусом гриппа А/Виктория после предварительного введения препарата "Криоцелл-гемокорд".

Материалы и методы

Эксперимент проводили на самках мышей линии Balb/C массой 18–20 г, которые составили следующие группы (по 10 животных в каждой):

1 – введение препарата "Криоцелл-гемокорд" (контроль);

2 – инфицирование вирусом гриппа А/Виктория в ЛД_{100/10} (контроль);

3 – введение препарата "Криоцелл-гемокорд" и инфицирование через 6 месяцев вирусом гриппа А/Виктория в ЛД_{100/10} (опыт).

Препараты вводили мышам интраназально в объеме 0,05 мл.

An initial state of immune system is of vital importance when a virus infection propagates. Particularly T-lymphocytes, which are the main factors in elimination of virus-infected cells, play a significant role in anti-virus protection. Central (thymus) and peripheral (spleen and lymph nodes) organs of immune protection, on the state of which the development of an anti-virus immune response depends, take part in formation of cytotoxic T-lymphocytes and T-helpers [1]. When the influenza course is severe, immune system is suppressed, that may result in bad complications, in particular primary virus hemorrhagic pneumonia followed by high mortality levels [2].

The preparation "Cryocell-Haemocord" elaborated in the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, which is a cryopreserved suspension of human cord blood nuclear cells in autologous plasma [7], was shown to exert a prophylactic effect towards the influenza viruses. Notably the infection of mice with a lethal dose of the influenza virus A/Victoria after the preliminary administration of the preparation did not lead to their death [3, 6]. It is possible that protective properties of the preparation "Cryocell-Haemocord" are due to its influence on immune system organs, as it contains cytokines, hormones, vitamins and microelements in the physiologically balanced ratio [4, 8].

The aim of the work is investigating the morpho-functional state of immune protection organs (thymus, lymph nodes and spleen) as well as lungs of animals infected with the influenza virus after a preliminary administration of the preparation "Cryocell-Haemocord".

Materials and Methods

The experiment was performed in mouse females (line Balb/C) with the weight of 18–20 g, which were divided into the following groups by 10 animals in each:

1 – introduction of the preparation "Cryocell-Haemocord" (control);

2 – infection with the influenza virus A/Victoria at the LD_{100/10} (control);

3 – introduction of the preparation "Cryocell-Haemocord" and infection with the influenza virus A/Victoria at the LD_{100/10} 6 months later (experiment).

The preparations were introduced to mice intranasally in the volume of 0.05 ml.

The experiments were carried out according to the "General ethical principles of experiments in animals" approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007).

Histological analysis of lung and immunocompetent organ parenchyma was performed 6 months after the introduction of the preparation as well as on the 7th and 14th days after the influenza virus infection.

Эксперименты проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007).

Гистологический анализ паренхимы легких и иммунокомпетентных органов животных осуществляли через 6 месяцев после введения препарата, а также на 7- и 14-е сутки после инфицирования вирусом гриппа.

В группе 2 к 10-м суткам все животные погибали, поэтому гистологическое исследование органов животных проводили только на 7-е сутки после инфицирования.

Для гистологического анализа органы животных фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, промывали в проточной воде, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Срезы из парафиновых блоков толщиной 6–8 микрон окрашивали гематоксилином и эозином для получения обзорных гистологических препаратов [5] и изучали с помощью светового микроскопа.

Результаты и обсуждение

Тимус. При гистологическом исследовании тимуса мышей группы 1 через 6 месяцев после введения препарата “Криоцелл-гемокорд” наблюдалось нормальное строение этого органа. Было сохранено дольчатое строение железы. Кортиковое вещество долек инфильтрировано Т-лимфоцитами, которые густо заполняли просветы сетевидного эпителиального остова (рис. 1, а). В подкапсулярной зоне коркового вещества тимуса обнаружены крупные пролиферирующие лимфоидные клетки. Мозговое вещество долек содержало меньшее количество лимфоцитов. В средней его части выявлены единичные слоистые тельца Гассалья, представляющие собой эпителиальные дегенерирующие клетки. В корковом и мозговом веществе тимуса часто встречались макрофаги.

В тимусе животных группы 2 на 7-е сутки отмечены инволютивные изменения, сопровождающиеся уменьшением количества лимфоцитов, особенно в корковом веществе, появлением липидных включений в соединительнотканых клетках, и развитие жировой ткани в септах. В данном случае временная (быстрая или акцидентальная) инволюция обусловлена воздействием чрезвычайно сильного раздражителя – инфицированием вирусом гриппа. Такая стресс-реакция сопровождалась массовой гибелью лимфоцитов, в результате чего граница между корковым и мозговым веществом была менее заметной (рис. 1, б). Выявлены разрастание эпителиальной стромы, увеличение количества слоистых эпителиальных телец Гассалья

In group 2 all the animals were dead by the 10th day, that is why histological analysis was performed only on the 7th day after the infection.

For histological analysis the animals' organs were fixed in 10% neutral formalin, washed in running water, dehydrated in ethanol at increasing concentrations, defatted in dimethylbenzene and embedded in paraffin. Sections from paraffin blocks at the width of 6–8 μm were stained with hematoxylin and eosin to obtain survey histological smears [5] and studied with light microscopy.

Results and discussion

Thymus. Histological analysis of thymus of the mice from group 1, which had been introduced with the preparation “Cryocell-Haemocord” 6 months earlier, showed that the structure of the organ was normal. Lobular structure of the gland remained intact. Lobe cortical substance was infiltrated with T-lymphocytes, which filled densely lumens of retiform epithelial hull (Fig. 1a). Large proliferating lymphoid cells are found in the subcapsular zone of thymus cortical substance. Medullary substance of lobes contained less lymphocytes. Solitary lamellar Hassall's corpuscles, which are epithelial degenerating cells, were seen in its middle part. Macrophages were often observed in cortical and medullary substances of thymus.

Involuntary changes accompanied by a decline in the lymphocyte quantity especially in cortical substance, occurrence of lipid inclusions in connective-tissue cells and development of adipose tissue in septa were noted in thymuses of the animals from group 2 on the 7th day. In this case temporary (fast or accidental) involution is attributed to the effect of an extremely strong stimulus, the influenza virus infection. Such stress response was accompanied by large scale death of lymphocytes, as a result of which the border between cortical and medullary substances became less visible (Fig. 1b). Epithelial stroma enlarged; the quantity of lamellar epithelial Hassall's corpuscles increased (a sign of degeneration of cortical substance cells); the quantity of macrophages also increased.

When thymuses of the mice from group 3 being studied on the 7th day after the infection, enlargement of cortical substance zone was observed; the border between cortical and medullary substances was visible. Epithelial retiform hull of the gland was clearly seen. Herewith dilated inter- and intralobular arteries were noted. Numerous blood vessels sometimes containing erythrocytes and capillaries formed a thick network in cortical substance (Fig. 1c). Larger and lighter nuclei of stroma reticuloendothelial cells and numerous dark small nuclei of lymphocytes were distinguished in medullary substance tissue. Hassall's corpuscles were seldom found. The largest lymphoid cells (lymphoblasts)

(признак деградации клеток мозгового вещества), а также макрофагов.

При исследовании тимуса мышей группы 3 на 7-е сутки после инфицирования наблюдали увеличение зоны коркового вещества и границу между корковым и мозговым веществом. Четко определялся эпителиальный сетчатый остов железы. При этом выявлены расширенные меж- и внутридольковые артерии. Многочисленные кровеносные сосуды, иногда содержащие эритроциты, и капилляры образовывали густую сеть в корковом веществе (рис. 1, в). В ткани мозгового вещества различались более крупные и светлые ядра ретикулоэндотелиальных клеток стромы и многочисленные темные мелкие ядра лимфоцитов. Тельца Гассала встречались очень редко. Наиболее крупные лимфоидные клетки (лимфобласты) пролиферировали и давали новые генерации лимфоцитов, что свидетельствовало о регенерации и обновлении тимуса.

На 14-е сутки в тимусе мышей группы 3 наблюдали увеличение зоны коркового вещества, инфильтрированного Т-лимфоцитами, которые густо заполняли просветы эпителиального каркаса железы. В подкапсулярной зоне коркового вещества выявлены крупные пролиферирующие лимфоидные клетки – лимфобласты, которые обнаруживались также в глубине коркового вещества (рис. 1, г). Хорошо видны эндотелиальные клетки многочисленных гемокapилляров, которые создают гематоканевую барьер, предохраняющий дифференцирующиеся лимфоциты от избытка антигенов. Выявлена хорошо различимая граница между корковым и мозговым веществом. Последнее имело более светлую окраску вследствие содержания значительно меньшего количества лимфоцитов. В средней части мозгового вещества определялись немногочисленные варьирующие по форме тельца Гассала.

Установлено, что предварительное введение препарата “Криоцелл-геоморд” мышам, впослед-

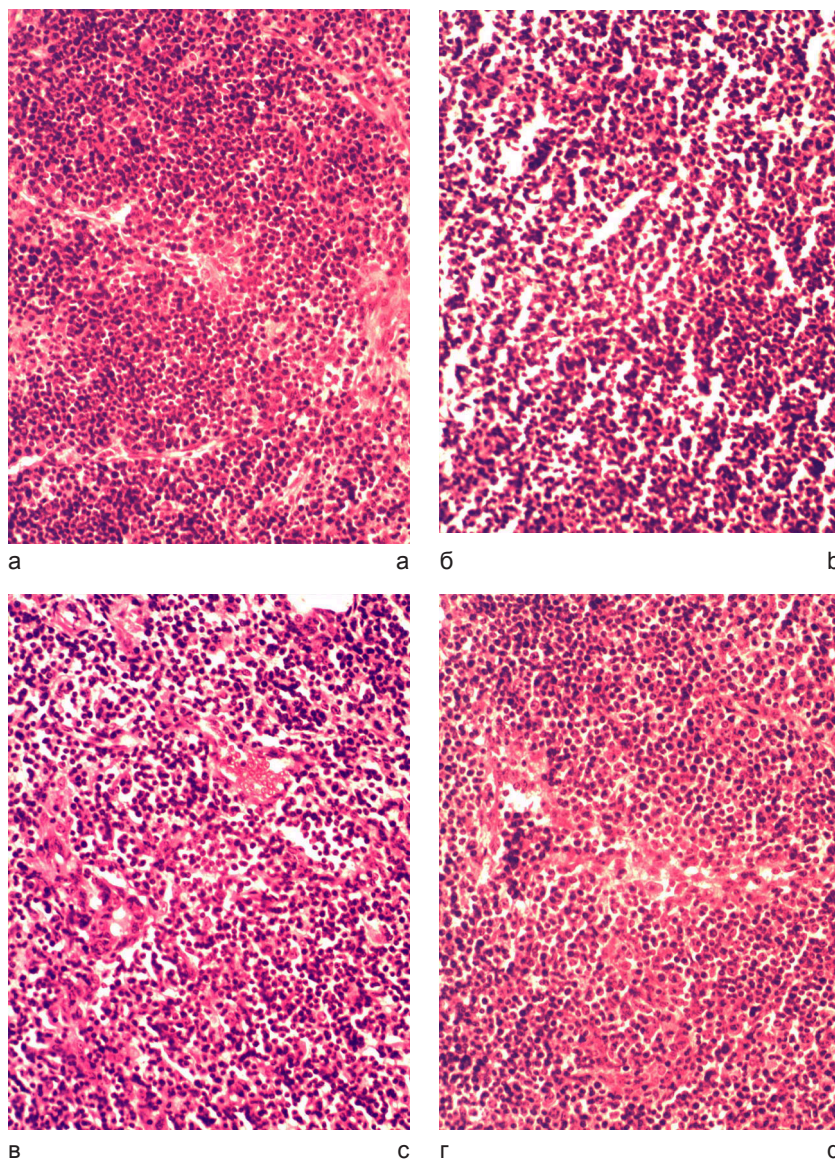


Рис. 1. Тимус мышей: а – через 6 месяцев после введения препарата “Криоцелл-геоморд”; б – зараженных вирусом гриппа (на 7-е сутки); в – зараженных вирусом гриппа через 6 месяцев после введения препарата (на 7-е сутки); г – зараженных вирусом гриппа через 6 месяцев после введения препарата (на 14-е сутки). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Fig. 1. Mice thymuses: а – 6 months after the administration of the preparation “Cryo-cell-Haemocord”; б – infected with the influenza virus (the 7th day); в – infected with the influenza virus 6 months after the administration of the preparation (the 7th day); д – infected with the influenza virus 6 months after the administration of the preparation (the 14th day). Hematoxylin and eosin staining. $\times 400$.

proliferated and yielded new generations of lymphocytes, which attested to renewal and regeneration of thymus.

On the 14th day in thymuses of the animals from group 3 cortical substance zone enlarged, it was infiltrated with T-lymphocytes, which filled densely lumens of the gland epithelial hull. Large proliferating lymphoid cells, lymphoblasts, were found in the subcapsular zone of cortical substance as well as in the depth of cortical substance (Fig. 1d). Endothelial cells of numerous

ствии инфицированным вирусом гриппа, предохраняет их тимус от дистрофических и некротических изменений, очевидно, за счет потенцирования пролиферации лимфоидных клеток и сохранения микроциркуляции этого органа.

Лимфоузлы. Гистологическое исследование лимфоузлов мышей контрольной группы 1 показало их нормальное строение. От соединительнотканной капсулы вглубь лимфоузлов отходили трабекулы, образующие опорный каркас. Строма лимфоузлов состояла из ретикулярной ткани. Лимфоциты коркового вещества лимфоузлов образовывали различные по форме и размерам скопления – вторичные узелки или фолликулы, которые местами сливались в массы неопределенной формы. Внутри некоторых лимфоидных узелков выявлены более светлые участки – герминативные реактивные центры (центры размножения), в которых обнаружено много больших и средних лимфоцитов, а также макрофагов. В глубокой зоне коры лимфоузлов определялись плотные диффузные скопления лимфоцитов – тимусзависимая паракортикальная зона. Основу паренхимы мозгового вещества узлов составляли мозговые тяжи – лентовидные скопления малых лимфоцитов (рис. 2, а). Между фолликулами, трабекулами и мозговыми тяжами были видны более светлые пространства – синусы (корковые и мозговые промежуточные), образованные ретикулярной тканью, с небольшим количеством лимфоцитов в просвете.

В лимфоузлах животных на 7-е сутки после заражения вирусом гриппа (группа 2) происходили патологические изменения: в центральной части лимфатических фолликулы, которые местами сливались в массы неопределенной формы, имели скопления фагоцитирующих клеток (реактивные центры). Это указывало на высокую реактивность лимфатических фолликулов при интоксикации организма, особенно вирусного происхождения. Кроме того, наблюдалась дилатация кровеносных сосудов лимфоузлов. При этом обнаруживались множественные кровоизлияния (рис. 2, б), когда кровь из сосудов изливалась в их синусы, где часто определялись эритроциты, что характерно при воспалительных процессах.

В коре лимфоузлов мышей группы 3 на 7-е сутки наблюдалось большое количество лимфатических фолликулов, находящихся на II и III стадиях развития. На II стадии у лимфатических фолликулов центры размножения были крупнее и содержали большее количество митотически делящихся клеток лимфопоэтического ряда (от 10 и более на срезе). Центральная часть фолликула была светлой (рис. 2, в). Для строения лимфатических фолликулов III стадии развития характерны появление

hemocapillaries, which form hemotissue barrier protecting differentiating lymphocytes against antigen excess, were clearly seen. The border between cortical and medullar substances was plainly distinguishable. The latter was lighter because of a considerably less quantity of lymphocytes. Hassall's corpuscles of varying shapes were few in number in the middle of medullar substance.

It was established that the preliminary introduction of the preparation "Cryocell-Haemocord" to mice thereafter infected with the influenza virus protected their thymuses against dystrophic and necrotic changes, perhaps due to potentiation of lymphoid cell proliferation and maintenance of microcirculation in the organ.

Lymph nodes. Histological analysis of lymph nodes of the mice from group 1 showed their normal structure. Trabecules forming support skeleton stretched from connective tissue capsule deep into lymph nodes. Lymph node stroma consisted of reticular tissue. Lymph node cortical substance lymphocytes formed clusters varying in shapes and sizes, secondary nodules of follicles, which fused in some places in masses of indefinite shape. Lighter areas, germinative reactive centres (proliferation centers), which comprised a lot of large and average lymphocytes as well as macrophages, were revealed inside some of lymphoid nodules. Dense diffusive lymphocyte clusters were observed in the deep zone of lymph node cortex, thymus-dependent paracortical zone. Medullar strands, ribbon-like clusters of small lymphocytes, made the basis of node medullar substance parenchyma (Fig. 2a). Lighter spaces, sinuses (cortical and medullar intermediate) formed by reticular tissue with few lymphocytes in lumens were seen between follicles, trabecules and medullar strands.

On the 7th day after the influenza virus infection in lymph nodes of the animals (group 2) pathological changes occurred: in the central part lymph follicles, which fused in some places in masses of indefinite shape, had clusters of phagocytizing cells (reactive centers). That indicated a high reactivity of lymph follicles during the organism's intoxication, especially of virus ethiology. Besides, lymph node blood vessel dilatation was noted. Herewith numerous hemorrhages (Fig. 2b) were found, when blood shed from vessels into their sinuses, where erythrocytes were often distinguished, which is typical for inflammatory processes.

On the 7th day in lymph node cortex of the mice from group 3 a lot of lymph follicles at developmental stages II and III were observed. At stage II in lymph follicles proliferation centers were larger and contained more dividing mitotically cells (10 and more in a section) of lymphopoietic series. The central part of a follicle was light (Fig. 2c). Occurrence of a "corona" from small lymphocytes around light centers and a certain

"короны" из малых лимфоцитов вокруг светлых центров и некоторое уменьшение количества митотически делящихся клеток, а также молодых клеток лимфопоэтического ряда. Все это свидетельствовало об интенсификации регенеративных процессов в лимфоузлах.

На 14-е сутки в лимфоузлах мышей группы 3 наблюдались приостановка регенеративных процессов и нормализация структуры. В коре лимфоузлов обнаруживались лимфатические фолликулы I стадии развития (формирования центров размножения), которые имели небольшой центр, состоящий преимущественно из молодых клеток лимфопоэтического ряда с базофильной цитоплазмой. Поэтому эти центры выглядели более темными. В них выявлены единичные митотически делящиеся клетки. Вокруг некоторых фолликулов обнаруживалась "корона" из малых лимфоцитов, что характерно для стадии относительного покоя (рис. 2, г). В кровеносных сосудах и капиллярах внутри мозговых тканей лимфоузлов эритроциты не были выявлены. Хорошо определялись ретикулоэндотелиальные "береговые" клетки, образующие стенку синусов.

Таким образом, профилактическое действие препарата "Криоцелл-гемокорд" проявляется в интенсификации регенеративных процессов в лимфоузлах инфицированных вирусом гриппа мышей и нормализации структуры этих органов уже к 14-м суткам.

Селезенка. Гистологическое исследование селезенки мышей группы 1 через 6 месяцев после введения препарата "Криоцелл-гемокорд", показало ее нормальное строение. Внутрь от соединительнотканной капсулы отходили трабекулы селезенки, которые в глубоких ее частях анастомозировали между собой. Соотношение красной и белой пульпы сдвинуто в сторону красной пульпы, состоящей из ретикулярной ткани с расположенными в ней клеточными элементами крови и многочисленными крове-

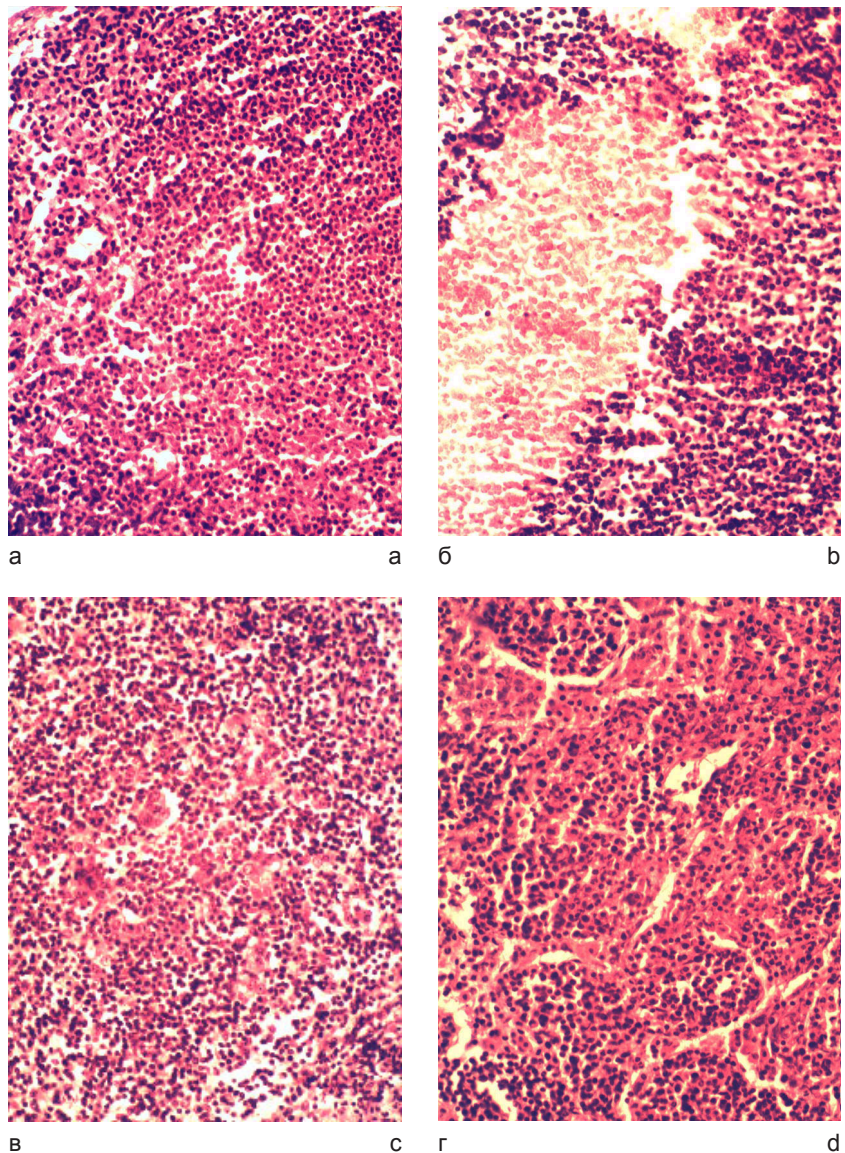


Рис. 2. Лимфоузлы мышей: а – через 6 месяцев после введения препарата "Криоцелл-гемокорд"; б – зараженных вирусом гриппа (на 7-е сутки); в – зараженных вирусом гриппа через 6 месяцев после введения препарата (на 7-е сутки); г – зараженных вирусом гриппа через 6 месяцев после введения препарата (на 14-е сутки). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Fig. 2. Mice lymph nodes: а – 6 months after the administration of the preparation "Cryocell-Haemocord"; б – infected with the influenza virus (the 7th day); в – infected with the influenza virus 6 months after the administration of the preparation (the 7th day); г – infected with the influenza virus 6 months after the administration of the preparation (the 14th day). Hematoxylin and eosin staining. $\times 400$.

decline in the quantity of dividing mitotically cells as well as young cells of lymphopoietic series are typical for lymph follicle structure at developmental stage III. All above-mentioned attested to intensification of regenerative processes in lymph nodes.

On the 14th day in lymph node cortex of the mice from group 3 regenerative processes ceased, and the structure became normal. Lymph follicles at developmental stage I (formation of proliferation centers),

носными сосудами, главным образом, синусоидного типа (рис. 3, а). Это свидетельствовало о нормальном кровенаполнении органа. В расположенных между синусами пульпарных тяжах выявлены очаги плазмцитогенеза. Лимфоидная ткань (белая пульпа селезенки) располагалась в адвентиции ее артерий в виде шаровидных скоплений или удлиненных лимфатических влагалищ (лимфатические фолликулы). В них проходили центральные артерии, которые располагались эксцентрично. От лимфатических фолликулов отходили гемокапилляры по направлению к краевым синусам красной пульпы. В лимфатических фолликулах можно различить три нечетко разграниченные зоны: периартериальную (центр размножения), мантийный слой и краевую (маргинальную).

Через 7 суток в селезенке мышей группы 2, зараженных вирусом гриппа, при гистологическом исследовании выявлены характерные для острых инфекций изменения: полнокровие, экссудация и инфильтрация лейкоцитами пульпы селезенки, пролиферация В-лимфобластов в центрах размножения фолликулов (рис. 3, б); скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами в виде хромофильных телец; дегенеративные и некротические изменения со стороны тканевых элементов пульпы и фолликулов.

В селезенке мышей группы 3 на 7-е сутки белая пульпа преобладала над красной, что свидетельствует о раздражении лимфоидной ткани антигенами. В многочисленных лимфатических фолликулах различались: периартериальные зоны (центры размножения), занимающие небольшие участки фолликула около артериолы; мантийный слой со слоистым расположением малых Т- и В-лимфоцитов, которые образуют “корону”, расслоенную циркулярно направленными толстыми ретикулярными волокнами; краевая зона, представляющая собой переходную область между белой и красной пульпой (рис. 3, в). Центры размножения фолликулов состояли из ретикулярных клеток и пролиферирующих В-лимфобластов. Здесь же обнаружены небольшие скопления макрофагов. Красная пульпа, занимающая относительно небольшую площадь, содержала большое количество гемокапилляров.

При исследовании селезенки мышей группы 3 на 14-е сутки установлена нормализация ее строения. Трабекулы селезенки, отходящие от соединительнотканной капсулы внутрь и в глубоких ее частях анастомозирующие между собой, представлены преимущественно эластическими волокнами, так как капсула и трабекулы составляют опорно-сократительный аппарат селезенки. Красная пульпа преобладала над белой. Основу пульпы составляла ретикулярная ткань, образующая ее строу. В адвентиции артерий, пронизывающих

which had small centers consisting of predominantly young cells of lymphopoietic series with basophilic cytoplasm, were found in lymph node cortex. That is why these centers looked darker. Solitary cells dividing mitotically were revealed in them. A “corona” from small lymphocytes, which is typical for the stage of relative quiescence, was visible (Fig. 2d). No erythrocytes were noted in blood vessels and capillaries inside lymph node medullar tissue. Reticuloendothelial Kupffer's cells forming sinus walls were plainly distinguished.

Thus, protective activity of the preparation “Cryocell-Haemocord” manifests itself as intensification of regenerative processes in lymph nodes of mice infected with the influenza virus and as normalization of the structure of these organs as early as by the 14th day.

Spleen. Histological analysis of spleens of the mice from group 1, which had been introduced with the preparation “Cryocell-Haemocord” 6 months earlier, showed their normal structure. Spleen trabecules anastomosing among themselves in deep parts of spleen stretched from the connective tissue capsule. The ratio between red and white pulps was shifted towards red one consisting of reticular tissue with blood cells and numerous blood vessels, mainly of sinusoid type, in it (Fig. 3a). That attested to a normal blood filling of the organ. Loci of plasmocytogenesis were revealed in pulpal strands located between sinuses. Lymphoid tissue (spleen white pulp) was situated in adventitia of its arteries in the form of sphere-like clusters or in elongated lymph sheaths (lymph follicles). Central arteries located eccentrically stretched in them. Hemocapillaries stretched from lymph follicles towards red pulp marginal sinuses. Three unclearly discriminated zones could be distinguished: periarterial one (proliferation center), mantle layer and marginal zone.

On the 7th day histological analysis revealed typical for acute infections changes in spleens of the mice infected with the influenza virus (group 2): plethora, exudation and infiltration of spleen pulp with leukocytes, proliferation of B-lymphoblasts in follicle proliferation centers (Fig. 3b); clusters of macrophages with phagocytized lymphocytes or their fragments as chromophilic corpuscles; degenerative and necrotic changes in pulp tissue elements and follicles.

On the 7th day in spleens of the mice from group 3 white pulp dominated over red one, that attests to irritation of lymphoid tissue by antigens. In numerous lymph follicles one can distinguish periarterial zones (proliferation centers) holding little areas of the follicle around the arteriole; a mantle layer with lamellar disposition of small Т- and В-lymphocytes, which formed a “corona” stratified with circularly directed thick reticular fibers; a marginal zone constituting transitional area between red and white pulps (Fig. 3c). Follicle proli-

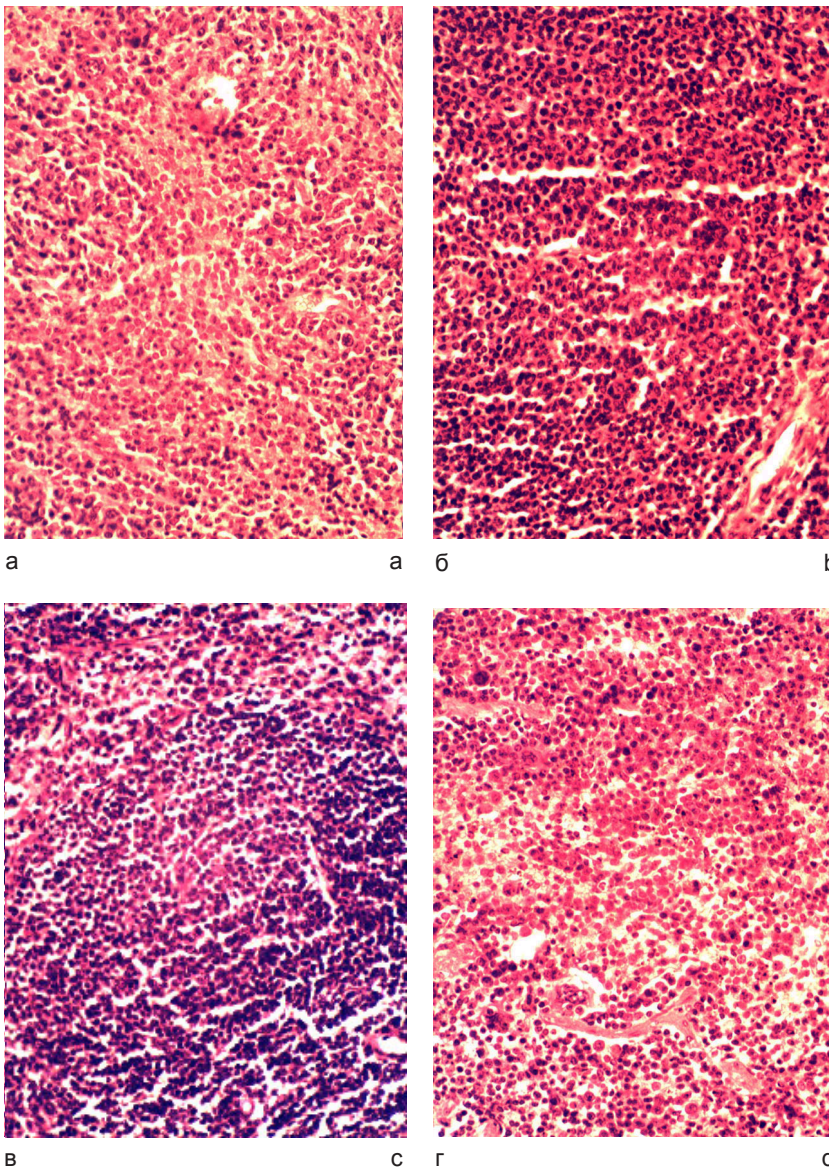


Рис. 3. Селезенка мышей: а – через 6 месяцев после введения препарата "Криоцелл-гемокорд"; б – зараженных вирусом гриппа (на 7-е сутки); в – зараженных вирусом гриппа через 6 месяцев после введения препарата (на 7-е сутки); г – зараженных вирусом гриппа через 6 месяцев после введения препарата (на 14-е сутки). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Fig. 3. Mice spleens: а – 6 months after the administration of the preparation "Cryocell-Haemocord"; б – infected with the influenza virus (the 7th day); в – infected with the influenza virus 6 months after the administration of the preparation (the 7th day); д – infected with the influenza virus 6 months after the administration of the preparation (the 14th day). Hematoxylin and eosin staining. $\times 400$.

селезенку, определялась лимфоидная ткань в виде округлых или овальных скоплений – лимфатических фолликулов (рис. 3, г).

Легкие. Гистологическое исследование паренхимы легких мышей группы 1 показало их нормальное строение. Ткань легких на препаратах имела ажурный вид вследствие того, что основную массу ее составляли разрезы тонкостенных концевых аль-

ферация centers consisted of reticular cells and proliferating B-lymphoblasts. Small clusters of macrophages were also revealed here. Red pulp holding a relatively little area comprised a lot of hemocapillaries.

On the 14th day in the mice from group 3 spleen structure was established to become normal. Spleen trabecules stretching from the connective-tissue capsule deep into the organ and anastomosing among themselves in deep its parts were predominantly elastic fibers, since the capsule and trabecules form support-contractile apparatus of spleen. Red pulp dominated over white one. The pulp basis was reticular tissue forming its stroma. Lymphoid tissue as round or oval clusters, lymph follicles, was noted in adventitia arteries running through spleen (Fig. 3d).

Lungs. Histological analysis of lung parenchyma of the mice from group 1 showed its normal structure. In the sections lung tissue was openwork because of its bulk consisted of thin-walled terminal alveole incisions. Small bronchi were lined with cubical epithelium; smooth muscle annular layer was revealed behind bronchial tube tunic. Individual small gland packages occurred in small bronchus submucosal layer. As the caliber of bronchi lessened, glands vanished. Small bronchi were accompanied by bronchial arteries, incisions of which were always visible nearby. Lung veins containing a lot of smooth muscles in their walls resembled arteries by their structure, but were located independently on bronchi (Fig. 4a). Respiratory lung parts (acini) began with alveolar bronchioles originated from the tiniest bronchi.

Alveolar bronchioles were acinus areas lined with cubical epithelium alternating with thin-walled alveolar protrusions. No muscles were noted in alveole walls. Most of lung sections were occupied by incisions of alveolar ducts and unequally expanded terminal alveolae. Alveolar macrophages were found on the inner surface of alveolae and in their cavities.

On the 7th day in lung parenchyma of the mice from group 2 spongioid structure only remained in small ar-

веол. Малые бронхи выстланы кубическим эпителием, за собственной их оболочкой обнаружен кольцевой слой гладких мышц. В подслизистом слое малых бронхов встречались отдельные небольшие пакеты желез. С уменьшением калибра бронхов железы исчезали. Малые бронхи сопровождались бронхиальными артериями, разрезы которых постоянно встречались возле них. Легочные вены, содержащие в своих стенках большое количество гладких мышц, сходны по строению с артериями, но располагались независимо от бронхов (рис. 4, а). Респираторные отделы легких (ацинусы) начинались альвеолярными бронхиолами, в которые переходили самые мелкие бронхи. Альвеолярные бронхиолы представляли собой участки ацинуса, выстланные кубическим эпителием, чередующиеся с альвеолярными выпячиваниями, имеющими очень тонкую стенку. В стенках альвеол мышц уже не было. Большая часть срезов легких была занята разрезами альвеолярных ходов и концевых альвеол, растянутых в разной степени. На внутренней поверхности альвеол и в их полости встречались альвеолярные макрофаги.

В паренхиме легких у мышей группы 2 через 7 суток только на небольших участках по краям легких сохранено губчатое строение, однако альвеолы местами растянуты, а местами – имели разрывы стенок. Непрерывный эндотелий альвеолярных капилляров только в некоторых местах сохранен. В большинстве случаев он слущивался, был плохо выражен, в результате чего наблюдались множественные кровоизлияния и заполнение альвеол кровью. Определялись деструкция альвеол в центральных отделах легких и их “опеченение” (геморрагическая пневмония). Во внутрилегочных бронхах разного калибра и бронхиолах обнаружены десквамация эпителия, истончение стенки бронхиальных артерий и вен, стазы кровеносных сосудов. В паренхиме легких имела место моноцит-лимфоцитарная инфильтрация – масса

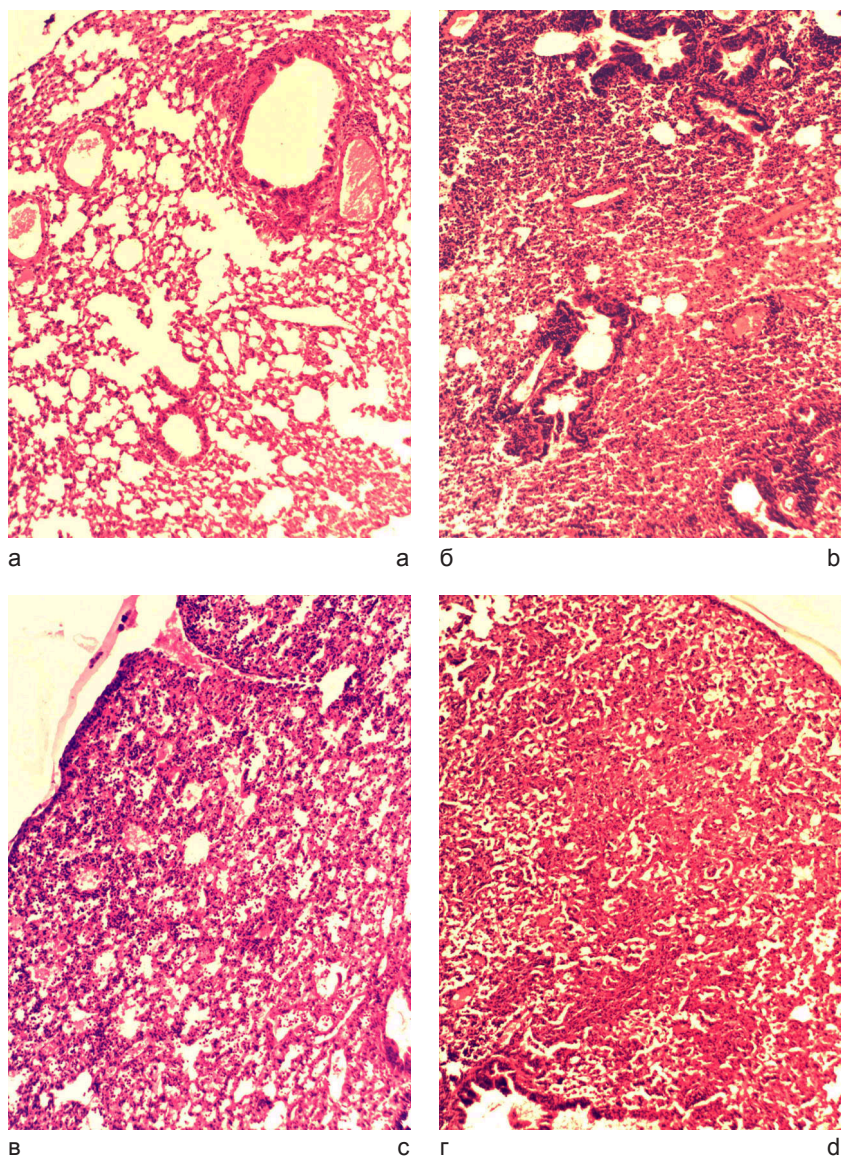


Рис. 4. Паренхима легких мышей: а – через 6 месяцев после введения препарата "Криоцелл-гемокорд"; б – зараженных вирусом гриппа (на 7-е сутки); в – зараженных вирусом гриппа через 6 месяцев после введения препарата (на 7-е сутки); г – зараженных вирусом гриппа через 6 месяцев после введения препарата (на 14-е сутки). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

Fig. 4. Mice lung parenchyma: а – 6 months after the administration of the preparation "Cryocell-Haemocord"; б – infected with the influenza virus (the 7th day); в – infected with the influenza virus 6 months after the administration of the preparation (the 7th day); д – infected with the influenza virus 6 months after the administration of the preparation (the 14th day). Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$.

еас along the lung edges, though alveolae were expanded in some places and ruptured in others. Endothelium in alveolar capillaries scarcely remained continuous. In most cases it was desquamated, indistinct, as a consequence of which multiple hemorrhages were observed, and alveolae were filled with blood. In the central parts of lungs alveolae were destructed and “hepatized” (hemorrhagic pneumonia). In intrapulmonic bronchi of various size and bronchiolae epithelium

нуклеаров, среди которых встречались сегментоядерные клетки (рис. 4, б).

При исследовании паренхимы легких мышей группы 3 на 7-е сутки установлено более или менее губчатое ее строение. Альвеолярные мешочки местами сужены, местами – растянуты. Эндотелий альвеолярных капилляров сохранен. При этом выявлены участки паренхимы с “опеченением”, где наблюдалась моноцито-лимфоцитарная инфильтрация. Дилатированные кровеносные сосуды с истонченной стенкой были заполнены эритроцитами. На внутренней поверхности альвеол часто встречались альвеолярные макрофаги. Эпителий терминальных бронхиол в некоторых местах был слущен, однако в большинстве случаев сохранял целостность (рис. 4, в).

Гистологический анализ паренхимы легких мышей группы 3 показал, что через 14 суток после инфицирования она имела губчатое строение. При этом альвеолы были то растянуты, то сжаты, в некоторых местах наблюдались разрывы их стенок. Эндотелий альвеолярных капилляров преимущественно сохранен. В альвеолярных ходах наблюдались небольшие скопления эритроцитов. Эпителий терминальных бронхиол в большинстве случаев сохранен. В паренхиме легких установлена умеренная моноцито-лимфоцитарная инфильтрация. Стенки кровеносных сосудов несколько истончены, а в некоторых из них наблюдались стазы (рис. 4, г).

Выводы

Гистологический анализ иммунокомпетентных органов экспериментальных животных показал, что предварительное (за 6 месяцев до инфицирования) введение препарата “Криоцелл-гемокорд” полностью защищает их от дистрофических и некротических повреждений, которые вызывает вирус гриппа. Установлено, что на 14-е сутки после инфицирования у животных, которым за 6 месяцев до этого был введен препарат “Криоцелл-гемокорд”, нормализуется строение всех тканевых структур, составляющих основу органов иммунологической защиты.

Предварительное введение препарата “Криоцелл-гемокорд” предотвращает также вызываемые вирусом гриппа патологические изменения в легких, приводящие к геморрагической пневмонии. Через 14 суток после инфицирования животных вирусом гриппа, которым предварительно был введен препарат “Криоцелл-гемокорд”, в большинстве случаев установлены нормализация паренхимы легких, сохранение эндотелия альвеолярных капилляров и эпителия терминальных бронхиол. Возможно, такое защитное действие препарата обусловлено влиянием на иммунную систему животных.

was desquamated; bronchial artery and vein walls were thinned; blood vessel stasis was noted. Monocyte-lymphocyte infiltration, a mass of nuclear leukocytes, among which segmented-nuclear cells were seen, occurred in lung parenchyma (Fig. 4b).

On the 7th day the structure of lung parenchyma of the mice from group 3 was more or less spongioid. Alveolar saccules were narrowed in some places and expanded in others. Alveolar capillary endothelium was intact. Herewith “hepatized” areas of parenchyma, where monocyte-lymphocyte infiltration was observed, were noted. Dilated blood vessels with thinned walls were filled with erythrocytes. Alveolar macrophages were often seen on the inner surface of alveolae. Terminal bronchiole epithelium was desquamated in some places, nevertheless in most cases it remained its integrity (Fig. 4c).

Histological analysis of lung parenchyma of the mice from group 3 showed that 14 days after infection its structure was spongioid. Herewith alveolae were expanded in some places and compressed in others; ruptures in their walls were noted somewhere. Alveolar capillary endothelium was predominantly intact. Small clusters of erythrocytes were observed in alveolar ducts. Terminal bronchiole epithelium remained intact in most cases. Monocyte-lymphocyte infiltration in lung parenchyma was moderate. Blood vessel walls were a little thinned; and stases were noted in some of them (Fig. 4d).

Conclusions

Histological analysis of the immunocompetent organs of the experimental animals showed that the preliminary (6 months prior to the infection) administration of the preparation “Cryocell-Haemocord” completely protected them against dystrophic and necrotic injuries caused by the influenza virus infection. It was established that on the 14th day after the infection in the animals, which had been introduced with the preparation “Cryocell-Haemocord” 6 months earlier, all the tissue structures forming the basis of the immune protection organs became normal.

The preliminary administration of the preparation “Cryocell-Haemocord” also prevented pathological changes in lungs caused by the influenza virus and leading to hemorrhagic pneumonia. 14 days after the infection with the influenza virus of the animals, which had been preliminary introduced with the preparation “Cryocell-Haemocord”, normalization of lung parenchyma, preservation of alveolar capillary endothelium and terminal bronchiole epithelium were registered in most cases. It is possible that such protective activity of the preparation is attributed to its influence on the animals' immune system.

Литература

1. *Абелев Г.И.* Основы иммунитета // Соросовский образовательный журн.– 1996.– №5.– С. 4–10.
2. *Возиянова Ж.И.* Инфекционные и паразитарные болезни. В 3-х т.– Киев: Здоров'я, 2000.– Т. 1.– С. 63–96.
3. *Желтякова И.А., Бровко Е.В.* Новый подход к профилактике гриппа // Медицина третьего тысячелетия: 3б. тез міжвузівської конф. молодих вчених.– Харків, 2006.– С. 93–94.
4. *Липина О.В., Савченко Ю.А., Мусатова И.Б.* Низкотемпературное консервирование плазмы кордовой крови // Биоимплантация на пороге XXI века: Сб. тезисов симпозиума по проблеме тканевых банков с международным участием.– Самара, 2001.– С. 22–23.
5. *Меркулов Г.А.* Курс патологогистологической техники.– Л.: Медгиз, 1961.– 340 с.
6. *Цуцаєва А.О., Глушко Т.О., Лобасенко Н.П. та інш.* Геморкорд – препарат комплексної терапії // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, №1.– С. 46–48.
7. *Пат. України №31847А, МПК А01N1/02.* Спосіб криоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.В. Кудокоцева та інш.; Заявлено 05.11.98; Опубл. 15.12.2000.– Бюл. № 7.
8. *Debieve F., Beerlandt S., Hubinont C., Thomas K.* Gonadotropins, prolactin, inhibin A, inhibin B, and activin A in human fetal serum from midpregnancy and term pregnancy // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2000.– Vol. 85, N2.– P. 270–274.

*Поступила 07.07.2009
Рецензент Н.А. Волкова*

References

1. *Abelyev G.I.* Principles of immunity // Soros Educational Journal.– 1996.– N5.– P. 4–10.
2. *Voziyanova Zh.I.* Infectious and parasitological diseases.– Kiev: Zdorovya, 2000.– Vol. 1.– P. 63–96.
3. *Zheltiyakova I.A., Brovko Ye.V.* A novel approach to the influenza prophylaxis // Medicine of the Third Millenium: Proceedings of the Conference of Young Scientists.– Kharkov, 2006.– P. 93–94.
4. *Lipina O.V., Savchenko Yu.A., Musatova I.B.* Low temperature preservation of cord blood plasma // Bioimplantation on the Threshold of the 21st century: Proceedings of the Symposium on Tissue Banking Issues with International Participation.– Samara, 2001.– P. 22–23.
5. *Merkulov G.A.* Course of pathologohistological techniques. - Leningrad: Medgiz, 1961.– 340 p.
6. *Tsutsayeva A.O., Glushko T.O., Lobasenko N.P. et al.* Hemocord – a preparation for complex therapy // Transplantologiya.– 2003.– Vol. 4, N1.– P. 46–48.
7. *Patent of Ukraine N31847A, IPC A01N1/02.* A method for cryopreservation of cord blood hemopoietic cells / A.O. Tsutsayeva, V.I. Grischenko, O.V. Kudokotseva *et al.*– Filed in: 11.05.98. Published in: 12.15.2000. Bul. N7.
8. *Debieve F., Beerlandt S., Hubinont C., Thomas K.* Gonadotropins, prolactin, inhibin A, inhibin B, and activin A in human fetal serum from midpregnancy and term pregnancy // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2000.– Vol. 85, N2.– P. 270–274.

Accepted in 07.07.2009