

**ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ
СЕЛЕЗІНКИ КРОЛІВ****Житомирський національний агроекологічний університет (м. Житомир)****Oksana_Fd@ukr.net**

Виконане дослідження є частиною наукової тематики кафедри анатомії і гістології факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агроекологічного 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 електро-негативних 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 субпопуляцій клітин [5]. І стало можливим імунофенотипування 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 популяцій 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-лімфоцити, 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. Мантийна 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 популяцій 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 морфофункціонального 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 генезу.

Об'єкт і методи дослідження. Для дослідження здійснювали відбір селезінки в стадії морфофункціональної 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 охолоджену 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 мишинні моноклональні антитіла датської фірми DAKO, експресуючі антигенні маркери CD4+ (Т-хелпери), CD8+(Т-цитотоксичні клітини і нормальні Т-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 (ІРІ) 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 вузликів чітко виділялась періартеріальна зона навколо центральної артерії, світлий центр, мантийна і маргінальна зони. У струк-

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. Імунокомпетентна 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 $6,2-6,4$ мкм і мали переважно округле, рідше – бобоподібне ядро та вузьку цитоплазму. В-лімфоцити дещо більші за розмірами – $8,3-8,5$ мкм, за своєю величиною близькі до середніх лімфоцитів. Субпопуляції лімфоцитів з кластерами CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ в пульпі селезінки розміщувались поодинокі (рис. 1) та дифузно (рис. 2), частіше утворювали ланцюги (рис. 3) або скупчення (рис. 4).

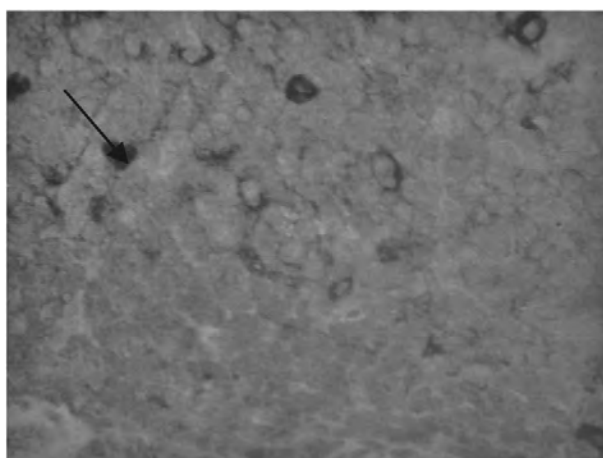


Рис. 1. CD4+-лімфоцити у червоній пульпі селезінки кролів. $\times 400$.

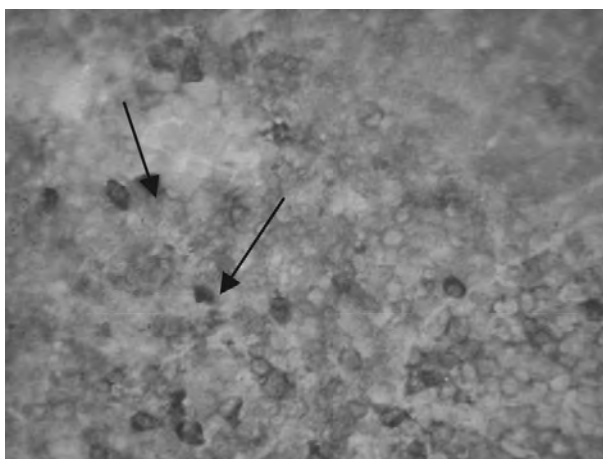


Рис. 2. CD8+-лімфоцити у періартеріальних лімфоїдних піхвах селезінки кролів. $\times 400$.

Кількість CD4+ в ПАЛП становила $20,25\%$ від загальної кількості популяції білої пульпи, решта ($79,75\%$) розташовувалась в ЛВ. В світлому центрі ЛВ їх кількість склала $45,29 \pm 13,34$ шт. на умовну одиницю площі (шт. на ум. од. пл.), в мантийній зоні – $34,14 \pm 9,96$ шт. на ум. од. пл., що становило $24,61\%$ і $75,39\%$ відповідно. Клітин CD8+ в ПАЛП нараховува-

лось $8,6 \pm 4,18$ 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 мантийній 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). ІРІ ПАЛП становив більше 1 ($1,34$) та менше 1 у білій пульпі ($0,92$), найменший ІРІ світлого центру ($0,53$), у мантийній зоні цей індекс дорівнював $0,90$.

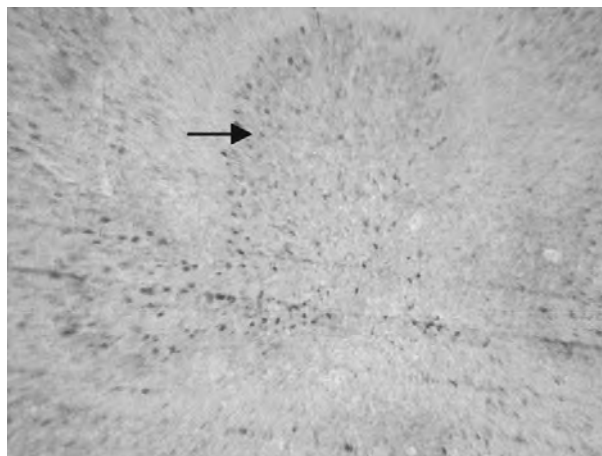


Рис. 3. CD19+-лімфоцити мантийної зони лімфоїдного вузлика селезінки кролів. $\times 80$.

Серед популяцій В-лімфоцитів на $0,7\%$ переважали CD19+ – лімфоцити у порівнянні з CD20+. Найбільша їх кількість знаходилась в мантийній 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 світлому центрі кількість CD19+ становила $32,64\%$ від загальної кількості популяції ЛВ білої пульпи, їх кількість нараховувала $18,33 \pm 2,36$ шт. на ум. од. пл. В світлому центрі кількість CD20+ 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

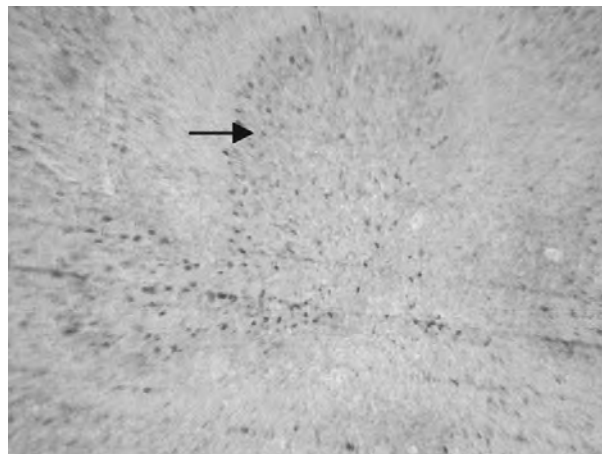


Рис. 4. CD20+-лімфоцити періартеріальної зони лімфоїдного вузлика селезінки кролів. $\times 80$.

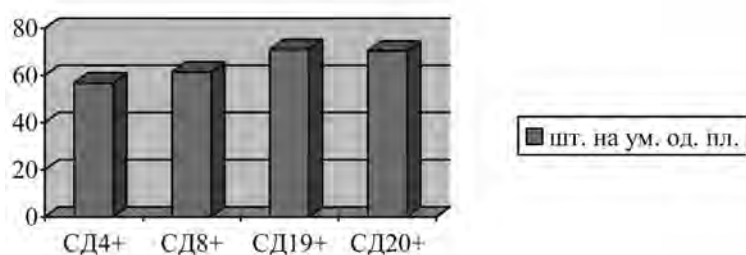


Рис. 5. Субпопуляції лімфоцитів білої пульпи селезінки кролів у кількісному вимірюванні.

пояснюється тим, що CD19⁺-лімфоцити знаходяться на самих ранніх етапах розвитку лінії, а CD20⁺-лімфоцити на стадіях диференціації В-клітин.

Кількісний аналіз субпопуляцій лімфоцитів білої пульпи селезінки кролів (рис. 5) свідчить, що серед досліджуваних Т-лімфоцитів CD8⁺. Це пояснюється отриманими результатами при дослідженні кластерів селезінки мишей [6]: CD8⁺ 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 площі структурної одиниці білої пульпи: світлий центр займає найменшу відносну площу, відповідно, кількість субпопуляцій найменша.

Висновки

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

вони розташовувались поодинокі в червоній пульпі, утворювали ланцюги і скупчення в білій пульпі.

2. Кількість CD4⁺ клітин в періартеріальних лімфоїдних піхвах становила 20,25 % від загальної кількості популяції білої пульпи. В лімфоїдному вузлику 75,39 % кластеру знаходилось в мантийній зоні.

3. В мантийній зоні популяція CD8⁺ 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, мантийної зони 0,90.

4. Серед популяцій В-лімфоцитів незначно переважали CD19⁺. Найбільша їх кількість знаходилась в мантийній зоні, найменша в періартеріальних лімфоїдних піхвах. В періартеріальних зонах лімфоїдних вузликів їх кількість зросла з поодиноких клітин до 8,50±1,12 і 11,75±1,48 шт. на ум. од. пл. (CD19⁺ і CD20⁺ 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 deyakni imunologichni pokazniki u zhinok z bezplidnyam trubnogo pohodzhennya / O.V. Bakun, O.A. Andriets, M.G. Oliynik [ta in.] // VisnikVDNZU «Ukrainska medichna stomatologichna akademiya». – 2012. – Т. 12. – Vip. 3 (39). – S. 116-118.
2. Gladkih A.A. Ekspresiya tsiklinov fazy S1 v V-zrelokletochnykh limfomah cheloveka: avtoref. diss. na soiskanie nauch. stepenya k. b. nauk: spets. 03.03.04 «Kletochnaya biologiya, tsitologiya, gistologiya» / A.A. Gladkih. – M., 2013. – 26 s.
3. Goralskiy L.P. Osnovi gistologichnoy tekhniki i morfofunktsionalni metodi doslidzhen u normi ta pri patologiyi: navch. posibnik / L.P. Goralskiy, V.T. Homich, O.I. Kononskiy. — Zhitomir: Polissya, 2005. — 288 s.
4. Dunaievska O.F. Osoblivosti morfologiyi selezinki kroliv / O.F. Dunaievska // Visnik Problem biologiyi i meditsini. – Poltava, 2016. – Vip. 1. – Т. 1 (126). – S. 80-83.
5. Panikar I.I. Morfogenez organiv immunoyi sistemi sviyskoyi svini na rannih etapah postnatalnogo periodu ontogenezu: avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stupenya d. vet. nauk: spets. 16.00.02 «Patologiya, onkologiya i morfologiya tvarin» / I.I. Panikar. – K., 2015. – 42 s.
6. Fedorovskaya N.S. Immunomorfologicheskaya karakteristika selezyonki pri tsitopeniyah immunnoho 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-κB, 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.immuni.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.

Встановлено, що лімфоцити CD4+, CD8+ більше зосереджувалися в мантийній зоні, ніж у світлому центрі лімфоїдного вузлика. Імунорегуляторний індекс періартеріальних лімфоїдних піхв становив 1,34, білої пульпи 0,92. Серед популяцій В-лімфоцитів незначно переважали CD 19+. Найбільша їх кількість знаходилась в мантийній 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

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЁНКИ КРОЛИКОВ

Дунаевская 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. Иммунорегуляторный индекс періартеріальних лімфоїдних муфт составлял 1,34, белой пульпы 0,92. Среди популяций В-лимфоцитов незначительно преобладали CD 19+. Наибольшее их количество находилось в мантийной зоне, наименьшее в періартеріальних лімфоїдних муфтах. В маргінальній зоні існують всі субпопуляції.

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 californian breed rabbits (6-8 months) 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±13,34 pieces per unit area, in mantle zone – 34,14± 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±4,18 pieces per unit area (13,99 % of the total number of population in the white pulp), in lymphoid nodule – 52,86±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± 8,94 and 37,80±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±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±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