

---

---

# БІОЛОГІЯ

---

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-52-55

УДК 636.92:591.441

Дунаєвська О. Ф.

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЛЕЗІНКИ СВИНИ Житомирський національний агроекологічний університет (м. Житомир)

Oksana\_Fd@ukr.net

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** 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.** Важливим напрямком фундаментальних досліджень селезінки є імуногістохімія. Сучасні імуногістохімічні методи дослідження створюють можливість для з'ясування стромальних взаємозв'язків в органі [1]. Це зумовлено тим, що імунна система, в тому числі лімфоїдна тканина селезінки, має унікальну здатність розпізнавати антигени і специфічно реагувати на них. Молекули (маркери) CD є рецепторами лімфоцитів, які відображають стан зрілості клітин та ступінь їх диференціації. Клітинну ланку імунітету характеризують Т-лімфоцити, зокрема CD4+ (Т-хелпери), CD8+ (Т-кілери або цитотоксичні клітини). Серед Т-лімфоцитів CD8+ важливими є клітини пам'яті [2,3]. За гуморальну імунну відповідь відповідають В-лімфоцити, для яких маркерами є CD19+, CD20+. Зараз проводиться імунофенотипування лімфоцитів у нормі, за патологічних станів організму, під впливом різних чинників [4,5,6,7]. Дослідження останніх років дозволили встановити, що в Т-залежній зоні селезінки (періартеріальні лімфоїдні піхви (ПАЛП) домінують лімфоцити CD3+ і CD4+, у зовнішніх відділах зони більш поліморфний склад, присутні популяції В-лімфоцитів. В Т-незалежній зоні (світлий центр (СЦ), мантийна зона (МанЗ) лімфоїдного вузлика (ЛВ) виявлявся різноманітний популяційний склад лімфоцитів: В-лімфобласти; дендритні клітини, які фіксують антиген і зберігають його протягом тривалого часу; вільні макрофаги; невелика кількість Т-лімфоцитів [2,8]. Т-лімфоцити CD8+ локалізуються не тільки в білій (БП), а й у червоній пульпі (ЧП) селезінки [9]. Необхідними для морфологічної характеристики селезінки є імуногістохімічні дослідження, які дозволяють встановити розподіл та вміст Т- і В-лімфоцитів.

**Мета дослідження.** З'ясувати особливості імуногістохімічної характеристики селезінки свині свійської, що ґрунтується на вивченні локалізації, розподілу, кількості субпопуляцій лімфоцитів CD4+, CD8+, CD19+, CD20+.

Отримані дані будуть включені до показників тест-системи органу в нормі.

**Об'єкт і методи дослідження.** Для дослідження здійснювали відбір селезінки в стадії морфофункціональної зрілості у клінічно здорових статевозрілих свиней домашніх *Sus scrofa, forma domestica L., 1758* (8-10 місяців, кількість 56) обох статей у співвідношенні 1:1 ТОВ «Волиньагрохолдинг» с. Маяки Луцького району Волинської області, ТОВ «Агрофірма Брусилів» смт. Брусилів Брусилівського району Житомирської області. Матеріал фіксували в 10–12 %-му охолодженому розчині нейтрального формаліну, в подальшому заливали в парафін [10]. Зрізи виготовляли на санному мікротомі МС-2 товщиною не більше 5 мкм. Для виявлення субпопуляцій лімфоцитів при світловій мікроскопії за допомогою мікроскопів МБИ-10 та Micros MC-50 (Австрія) використовували мишині моноклональні антитіла датської фірми DAKO, маркери CD4+, CD8+, CD19+, CD20+. Визначали розміщення та вміст (абсолютну і відносну кількість) [10].

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» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р., м. Київ).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що відносна площа БП селезінки становила  $11,11 \pm 1,5$  %, ЧП –  $78,87 \pm 2,36$  %, відносна площа Т-залежних зон – 5,5 %, В-залежних зон – 5,61 % [11]. Згідно наших імуногістохімічних досліджень селезінки свиней, у яких гістоархітектоніка селезінки вже сформована, клітини з маркерами CD4+ розміщені дифузно (**рис. 1**). Характерним є і розташування у невеликій кількості Т-клітин з маркерами CD4+ в маргінальній зоні (МЗ) ЛВ. При тім в періартеріальній зоні (ПаЗ) ЛВ спостерігається велика концентрація клітин з маркерами CD4+, CD8+, які тісно прилягають до адвентицію судин (**рис. 1**). В центральній зоні вузлика містяться клітинні скупчення з 2-3 лімфоцитів CD8+. В окремих випадках поодинокі клітини з маркерами CD4+, CD8+ виявляються і поза зоною ЛВ. В СЦ, МанЗ, МЗ скон-

центровані лімфоцити з маркерами CD19+, CD20+. В ЧП селезінки лімфоцити CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ мають розріджене розташування.

Згідно цитоморфометричного аналізу селезінки свині, лімфоцити з маркерами CD4+ розподілялись в пульпі нерівномірно: переважна більшість локалізувалась в ЛВ (66,97 %), в ПАЛП БП селезінки виявлялось 30,73 % від загальної кількості популяції пульпи, незначна решта (2,30 %) розташовувалась в ЧП (рис. 2). У структурі ЛВ такі лімфоцити розподілені також нерівномірно. Так, 39,95 % було локалізовано в ПаЗ, що нараховувало 26,17±7,43 шт. на ум. од. пл. Найменша кількість таких лімфоцитів виявлялась в МанЗ ЛВ (6,52 % або 4,24±1,28 шт. на ум. од. пл.). В СЦ ЛВ їх кількість дорівнювала 20,43±5,12 шт. на ум. од. пл., в МЗ – 14,63±3,07 шт. на ум. од. пл. Лімфоцити CD8+ були переважно сконцентровані в ЛВ БП (60,28 %). В ПАЛП нараховувалось 22,28±4,17 шт. на ум. од. пл. (38,1 % від загальної кількості популяції в пульпі селезінки), в ЧП вміст дорівнював 1,62 %, що становило лише 0,95±0,78 шт. на ум. од. пл. В ЛВ селезінки їх кількість переважала майже в 1,5 рази у порівнянні з ПАЛП і становила відповідно 35,25±9,26 шт. на ум. од. пл., і розташовувались вони щільніше. Морфометричними дослідженнями встановлено, що в МанЗ ЛВ даної популяції було значно менше у порівнянні з СЦ ЛВ у 5,95 разів (2,39±0,85 шт. на ум. од. пл. і 10,86±2,83 шт. на ум. од. пл. відповідно). В ПаЗ ЛВ кількість лімфоцитів CD8+ становила 14,21±2,38 шт. на ум. од. пл., що становила 40,3 % від загальної кількості ЛВ БП селезінки.

Серед популяцій В-лімфоцитів пульпи селезінки свині дещо переважали CD19+-лімфоцити у порівнянні з лімфоцитами CD20+ (75,14±7,13 і 71,95±7,36 шт. на ум. од. пл. відповідно). Найбільша кількість таких лімфоцитів знаходилась в ЛВ (58,56±8,49 шт. на ум. од. пл.), найменша в ЧП (6,46±2,17 шт. на ум. од. пл.), що становило 77,93 % і 8,6 % відповідно. В ПАЛП БП їх частка дорівнювала 13,47 %, що нараховувало 10,12±3,28 шт. на ум. од. пл. В ЛВ лімфоцити CD19+ домінували в МЗ, їх кількість становила 26,33±5,43 шт. на ум. од. пл., що складало 44,96 % від популяції ЛВ БП селезінки свині. В СЦ ЛВ кількість лімфоцитів CD19+ становила 29,92 % від загальної кількості таких лімфоцитів ЛВ БП і дорівнювала 17,52±3,41 шт. на ум. од. пл. В МанЗ і ПаЗ ЛВ лімфоцити з маркерами CD19+ займали 14,38 % та 10,74 % від загальної їх кількості ЛВ (8,42±2,73 і 6,29±1,84 шт. на ум. од. пл. відповідно). Імуногістохімічні дослідження встановили розподіл лімфоцитами з маркерами CD20+ наступним чином: 76,96 % локалізовано в ЛВ БП, 13,0 % в ПАЛП БП і 7,23 % в ЧП, що дорівнювало 55,37±7,21, 9,35±2,17 і 7,23±1,14 шт. на ум. од. пл. відповідно. Дані лімфоцити в ЛВ розподілялись подібно до лімфоцитів з маркерами CD19+, тобто, найбільша частка виявлялась в МЗ (43,83 %), найменша – в ПаЗ ЛВ – 9,08 %, їх кількість при цьому нараховувала 24,27±4,06 шт. на ум. од. пл. і 5,03±1,29 шт. на ум. од. пл. відповідно.

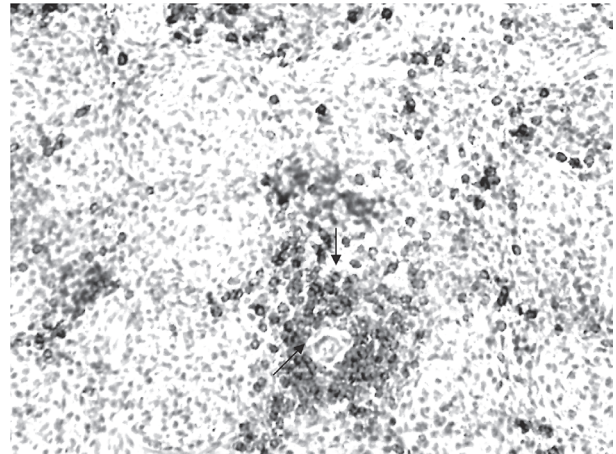


Рис. 1. Розміщення лімфоцитів CD4+, CD8+ навколо артерії ПАЛП. Гематоксилін з дофарбовуванням гематоксиліном Майєра. ×160.

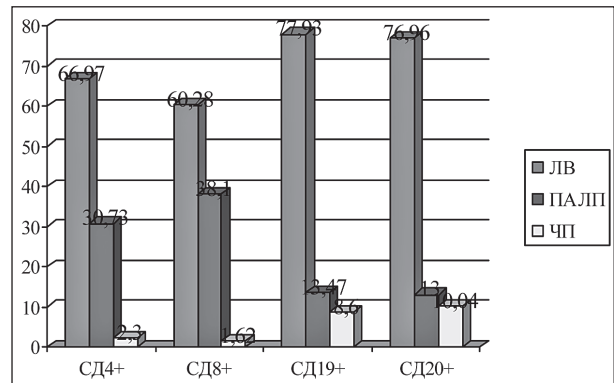


Рис. 2. Розподіл лімфоцитів в пульпі селезінки свині (%).

### Висновки

1. Популяції лімфоцитів CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ розташовувались поодинокі та дифузні в червоній пульпі, утворювали ланцюги і скупчення в білій пульпі селезінки свині.

2. Кількість лімфоцитів CD4+ в ПАЛП селезінки від загальної кількості популяції пульпи становила 30,73 %, решта лімфоцитів CD4+ розташовувалась в ЛВ та червоній пульпі. Клітини CD8+ локалізувались переважно в ЛВ (60,28 %), в ПАЛП ця кількість була значно меншою (38,1 %), в ЧП не перевищувала 1,62 %.

3. Серед популяцій В-лімфоцитів дещо переважали CD20+-лімфоцити у порівнянні з CD19+. Найбільше вони були сконцентровані в ЛВ – 76,96 %. Лімфоцити CD19+ домінували в ЛВ – 77,93 %. В ЧП селезінки кількість лімфоцитів CD19+ та CD20+ була більшою за кількість лімфоцитів CD4+, CD8+ майже вдвічі. Слід зазначити, що в маргінальній зоні ЛВ БП 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 свиней з врахуванням різних вікових та породних груп.

**Література**

1. Kvaratsheliya AG, Klochkova SV, Nikityuk DB, Alekseeva NT. Morfologicheskaya karakteristika timusa i selezyonki pri vozdeystvii faktorov razlichnogo proishozhdeniya. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2016;5(3):77-83. [in Russian].
2. Panikar II. Morfogenez organiv immunoyi sistemi sviyskoyi svini na rannih etapah postnatalnogo periodu ontogenezu [avtoreferat]. K.: NYBiP; 2015. 42 s. [in Ukrainian].
3. Brinza L, Djebali S, Tomkowiak M, Mafille J, Loiseau C, Schicklin S, et al. Immune signatures of protective spleen memory CD8 T cells. Scientific Reports. 2016. DOI: 10.1038/srep37651
4. Dunaievska OF. Immunogistohimichna karakteristika subpopulyatsiy limfotsitiv selezinki kroliv. Visnik problem biologiyi i meditsini. 2017;3;2(138):60-3. [in Ukrainian].
5. Dunaievska OF. Immunogistohimichna karakteristika subpopulyatsiy limfotsitiv selezinki golubiv ta kurey. Ukrainian Journal of Ecology. 2018;8(1):282-8. Dostupno: DOI: [http://dx.doi.org/10.15421/2018\\_213](http://dx.doi.org/10.15421/2018_213) [in Ukrainian].
6. Xiaoxu D, Gao S, Li J, Wu L, Zhang Y, Li W, et al. Acute arsenic exposure induces inflammatory responses and CD4+Tcell subpopulations differentiation in spleen and thymus with the involvement of MAPK, NF- $\kappa$ B, and Nrf2 / Nrf2. Molecular Immunology. 2017;81:160-72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.12.005> 0161-5890
7. Benkisser-Petersen M, Buchner M, Dörffel A, Dühren-von-Minden M, Claus R, Kläsener K, et al. Spleen Tyrosine Kinase Is Involved in the CD38 Signal Transduction Pathway in Chronic Lymphocytic Leukemia. PLOS ONE. 2016 December 30. DOI: 10.1371/journal.pone.0169159
8. Fedorovskaya NS, Dyakonov DA. Immunomorfologicheskaya karakteristika selezyonki pri tsitopeniyah immunogo genezisa. Kirov: Avers; 2013. 101 s. [in Russian].
9. Seo YJ, Jothikumar P, Suthar MS, Zhu C, Grakoui A. Local Cellular and Cytokine Cues in the Spleen Regulate In Situ T Cell Receptor Affinity, Function, and Fate of CD8+ T Cells. Immunity. 2016 [cited 10 Dec 2016];45:988-98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.024>
10. Goralskiy LP, Homich VT, Kononskiy OI. Osnovi gistologichnoy tehniki i morfofunksionalni metodi doslidzhen u normi ta pri patologiyi. Zhitomir: Polissya; 2012. 288 s. [in Ukrainian].
11. Dunaievska OF. Morfometrichni osoblivosti selezinki sviney. Visnik Lvivskogo un-tu. Ser.: biologichna. 2016;72:202-9. [in Ukrainian].

**ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЛЕЗІНКИ СВИНІ****Дунаєвська О. Ф.**

**Резюме.** Представлені результати розміщення, кількісного вмісту субпопуляцій лімфоцитів CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ селезінки статевозрілих свиней віком 8-10 місяців, враховано імунорегуляторний індекс. Встановлено, що лімфоцити CD4+, CD8+ більше зосереджувалися в періартеріальних лімфоїдних піхвах та періартеріальних зонах лімфоїдного вузлика. Імунорегуляторний індекс пульпи селезінки дорівнював 1,71. Серед популяцій В-лімфоцитів незначно переважали CD 19+. Найбільше лімфоцитів CD19+, CD20+ локалізувалось в мантийній, маргінальній зонах та світлому центрі лімфоїдних вузликів.

**Ключові слова:** селезінка, імуногістохімія, CD-лімфоцити, морфологія, морфометрія, свиня, пульпа, лімфоїдний вузлик.

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЛЕЗЕНКИ СВИНЬИ****Дунаевская О. Ф.**

**Резюме.** Представлены результаты размещения, количественного содержания субпопуляций лимфоцитов CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ пульпы селезёнки половозрелых свиней возрастом 8-10 месяцев, рассчитан иммунорегуляторный индекс. Установлено, что лимфоциты CD4+, CD8+ больше сосредоточивались в периаартериальных лимфоидных влагалищах и периаартериальных зонах лимфоидного фолликула. Иммунорегуляторный индекс пульпы селезёнки был равен 1,71. Среди популяций В-лимфоцитов незначительно преобладали CD19+. Больше всего лимфоцитов CD19+, CD20+ локализовалось в мантийной, маргинальной зонах и светлом центре лимфоидных фолликулов.

**Ключевые слова:** селезёнка, иммуногистохимия, CD-лимфоциты, морфология, морфометрия, свинья, пульпа, лимфоидный фолликул.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF THE PIG'S SPLEEN****Dunaievska O. F.**

**Abstract.** Immunohistochemical studies should be carried out at the pathological states of the organism, first of all, with violations in the work of the immune system, the study of the impact on the population of various factors. It is especially important to implement it for productive farm animals in order to obtain safe food products.

**Object and methods.** For research was selection of mature spleens of pig (8-10 months) of both sexes (ratio female: male was 1:1).

For histological studies, pieces of material are recorded in a 10-12% refrigerated neutral formalin solution, with subsequent filling in paraffin. The paraffin sections were made at the sledge microtome MC-2, with a thickness of fewer than 5 microns. For the detection and study of lymphocyte subpopulations, light microscopy used mouse monoclonal antibodies from the Danish firm DAKO, markers of CD4 +, CD8 +, CD19 +, and CD20 +. The placement and content (absolute and relative quantity) and the quantitative population ratio were determined.

**Research results.** Subpopulations of lymphocytes with CD4+, CD8+, CD19+, and CD20+ were isolated and diffuse, often forming chains or clusters. The lymphocytes with markers CD4+, CD8+, CD19+, CD20+ have a rarefied location in the red pulp of the spleen.

CD4+ lymphocytes were unevenly distributed in the pulp: the overwhelming majority was localized in lymphoid nodule (66,97 %), in lymphoid sheaths near the vessels of white splenic pulp was 30,73 % of the total number of pulp populations, the smallest remainder (2,30 %) was located in red pulp. In the structure of lymphoid nodule, these lymphocytes were also distributed unevenly: 39,95 % were localized in the zone near the vessels, 6,52 % – in mantle zone of lymphoid nodule (or 4,24±1,28 pieces per unit area), in the light centre of lymphoid nodule their number was equal to 20,43±5,12 pieces per unit area, in the marginal zone – 14,63±3,07 pieces per unit area). The CD8+ lymphocytes were predominantly concentrated in the lymphoid nodule of white pulp (60,28 %), the remainder – in lymphoid sheaths near the vessels, to wit 38,1 % or 22,28±4,17 pieces per unit area and insignificant in red pulp – 1,62 %, which was only 0,95±0,78 pieces per unit area. The morphometric studies have shown that in the mantle zone of the lymphoid nodule of this population was significantly less in 5,95 times the light center of the lymphoid nodule (2,39±0,85 pieces per unit area and 10,86±2,83 pieces per unit area, respectively). The amount of lymphocytes CD8+ in the in a zone near the vessels of the lymphoid nodule was 14,21±2,38 pieces per unit area, which was 40,3 % of the total number of lymphoid nodule white pulp spleen.

Among the populations of B-lymphocytes, the spleen of the pig's spleen was slightly superior to CD19 + -lymphocytes compared with lymphocytes with markers of CD20+ (75,14±7,13 and 71,95±7,36 pieces per unit area, respectively). The largest number of these lymphocytes were found in the lymphoid nodule (77,93 %), and the lowest – in red pulp (8,6 %). In lymphoid sheaths near the vessels of the white pulp, their share was 13,47 %. In lymphoid nodule, lymphocytes CD19+ were dominated in the marginal zone (44,96 %). In the light center of a lymphoid nodule, the number of lymphocytes CD 19+ was amounted to 29,92 % of the total number of this lymphoid nodule in white pulp lymphocytes and was 17,52±3,41 pieces per unit area. In the mantle zone and zone near the vessels of lymphoid nodule lymphocytes with markers CD19+ were occupied 14,38 % and 10,74 % of their total lymphoid nodule number. Immunohistochemical studies have established the distribution of lymphocytes with markers of CD20+ as follows: 76,96 % was localized in the lymphoid nodule of white pulp, 13,0 % in a zone near the vessels of white pulp and 7,23 % in red pulp.

**Key words:** spleen, immunohistochemistry, CD-lymphocytes, morphology, morphometry, pig, pulp, lymphoid follicles.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.  
Стаття надійшла 20.03.2018 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-55-61

УДК 57.017.053:615.91

*Кратенко Р. І.*

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ**

### **КРАУН-ЕТЕРІВ НА ОРГАНІЗМ ТЕПЛОКРОВНИХ ТВАРИН**

**Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди (м. Харків)**

**royalpear@ukr.net**

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Робота є фрагментом НДР «Механізм біологічної дії ксенобіотиків на організм теплокровних тварин» (№ державної реєстрації 0111U011921).

**Вступ.** Попередні наші повідомлення стосувалися біологічної активності краун-етерів у під гострому [1,2] та хронічному [3] токсикологічних експериментах, і було показано негативний вплив цих речовин на стан мембран клітин, процеси мікросомального окиснення, деякі ланки ендокринної системи щурів.

**Метою** даного дослідження було вивчення загальної токсичної дії речовин на організм теплокровних тварин в умовах гострого та під гострого токсикологічних експериментів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Токсикологічні дослідження з визначенням параметрів токсичності виконані на статевозрілих щурах популяції Wistar, білих мишах та морських свинках з урахуванням методичних вказівок О.М. Єлізарової [4]. У кожній групі було

по 10 тварин. Тваринам перорально за допомогою зонда вводили водні розчини речовин одноразово у діапазоні доз 1,0-10,0 г/кг маси у випадку гострого експерименту та щоденно протягом 30 діб у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 LD<sub>50</sub> у випадку підгострого. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми води. Дослідження біохімічних параметрів здійснювали через 30 діб після початку експерименту, а для деяких – ще й на 15-ту добу у крові, яку відбирали з під'язикової вени.

**Клінічні прояви гострого отруєння** вивчали з урахуванням методичних рекомендацій Єлізарової [4]. Дози були обрані таким чином, щоб визначити летальний ефект в інтервалі доз LD<sub>0</sub>-LD<sub>100</sub>. Спостереження за тваринами проводили протягом 15 діб. Реєстрували час загибелі тварин і сумарну кількість введеної речовини. Оцінювання результатів проводили на підставі середнього ефективного часу загибелі тварин [5].