УДК 616.411-003.96-008.922.1-018.1

И.В. Гриневич

Влияние адаптации к гипоксической гипоксии на клеточный состав селезенки

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: *тимус, гипоксия.*

Исследовано влияние дозированных ГТ на клеточный состав лимфоидных фолликулов белой пульпы селезенки контрольных и диабетических крыс линии Вистар. Установлено, что ГТ контрольных крыс приводят к увеличению численности $CD8^+$-лимфоцитов, клеток, экспрессирующих белки Bcl-2 и p53, MHC-2^+-клеток, тогда как ГТ животных с ЭСД вызывают менее значимый эффект.

Вплив адаптації до гіпоксичної гіпоксії на клітинний склад селезінки

І.В. Гриневич

Досліджено вплив дозованих ГТ на клітинний склад лімфоїдних фоллікулів білої пульпи селезінки контрольних і діабетичних щурів лінії Вістар. Встановлено, що ГТ контрольних щурів призводять до збільшення кількості $CD8^+$-лімфоцитів, клітин, що експресуюють білки Bcl-2 і p53, MHC-2^+-клітин, тоді як ГТ тварин з ЕЦД викликають менш значущий ефект.

Ключові слова: *тимус, гіпоксія.*

Патологія. – 2011. – Т.8, №2. – С. 127–129

The influence of hypoxic hypoxia adaptation on the spleen cells content

I.V. Grinevich

It was investigated the influence of dosed hypoxic trainings (HT) on cellular composition of lymphoid follicles and spleen white pulp of control and diabetic Wistar rats. It has been established that HT control rats led to an increase in the number of CD8 +-lymphocytes, cells expressing the protein Bcl-2 and p53, MHC-2 + cells, whereas HT animals with EDM caused less significant effect.

Key words: *spleen, hypoxic hypoxia.*

Pathologia. 2011; 8(2): 127–129

Гипоксия является одним из наиболее широко распространенных патологических процессов в клинической практике, поэтому вопросы изучения механизмов адаптации к этому фактору всегда остаются актуальными для современной биологии и медицины [1]. Гипоксические тренировки (ГТ) вызывают в организме человека и животных сложную интегральную реакцию, определенная роль в которой принадлежит системе иммуногенеза [2]. Кроме того, известно, что ГТ диабетических крыс оказывают корригирующее влияние на течение патологического процесса, и, возможно, определенная роль в этих эффектах принадлежит системе иммуногенеза [3,4]. Вместе с тем, особенности функционирования иммунной системы при адаптации организма к гипоксии в норме и в условиях диабета изучены недостаточно и отличаются противоречивостью данных [5–7].

Цель работы

Изучение особенностей лимфоидного состава белой пульпы селезенки контрольных и диабетических крыс в динамике адаптации к дозированным гипоксическим воздействиям.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 84 самцах крыс линии Вистар массой 230–250 г (возраст 5–6 месяцев). Животные разделены на 7 экспериментальных групп: интактные крысы, которые служили контролем (группа 1); крысы, подвергавшиеся 10 ГТ (группа 2); крысы, подвергавшиеся 10 ГТ и наблюдавшиеся в течение последующего 10-дневного пост-гипоксического периода (ПГП) (группа 3); крысы с 28- и 38-дневным ЭСД (группы 4 и 5, соответственно); крысы с 28-дневным ЭСД, подвергавшиеся 10 ГТ, начиная с 18 суток диабета (группа 6); крысы с 38-дневным ЭСД, подвергавшиеся 10 ГТ, начиная с 18 суток диабета и наблюдавшиеся в течение последующего 10-дневного ПГП (группа 7).

Ежедневные ГТ в течение 6 часов осуществляли в вентилируемой барокамере, режим ГТ был следующим: в 1 день напряжение кислорода в барокамере соответствовало высоте 1 км, на 2 день – 2 км, на 3 – 3 км, на 4 – 4 км, на 5 – 5 км, на 6 и в последующие дни – 6 км. В дальнейшем интенсивность гипоксической нагрузки учитывали по количеству 6-километровых ГТ. В последующем крыс декапитировали под наркозом (этаминал натрия 40 мг/кг), выделяли селезенку, которую фиксировали в жидкости Буэна (18 часов) и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин. Характеристику процессов антигенной дифференцировки лимфоцитов оценивали иммуноцитофлуоресцентным (ИФР) методом идентификации поверхностных антигенных детерминант CD4 и CD8 в серийных гистологических срезах селезенки с помощью МКАТ к CD4- и CD8-антигенам крысы, конъюгированным с FITC (Beckman Coulters, США) с последующим морфометрическим анализом и количественной оценкой ИФР реакции. Состояние пролиферативной активности лимфоцитов селезенки оценивали на основе методики

© И.В. Гриневич, 2011

ИФР выявления ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA с помощью первичных МКАТ к PCNA крысы и вторичных антител, конъюгированных с FITC (Sigma Chemical, США). Экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 в гистологических срезах селезенки выявляли с помощью МКАТ к Bcl-2 крысы и вторичных антител, конъюгированных с FITC (Sigma Chemical, США). Антиген-представляющие клетки (АПК) выявляли с использованием МКАТ к МНС-II-антигену крысы, конъюгированных с FITC (Beckman Coulter, США). Экспрессию белка p53 выявляли с помощью МКАТ к p53 крысы и вторичных антител, конъюгированных с FITC или Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, США). Исследование препаратов проводили на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) с помощью иммерсионного объектива 40^x. Исследовали лимфоидные фолликулы белой пульпы селезенки, изображения которых с помощью видеокамеры COHU-4922 (США) вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Статистическое оценивание экспериментальных данных и достоверность отличий в группах определяли t-статистикой Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Нами установлено, что ГТ контрольных крыс в течение 10 дней, а также 10-дневный ПГП не сопровождались изменениями суммарной плотности $CD4^+$ клеток в лимфоидных фолликулах белой пульпы селезенки. При этом если ГТ приводили к достоверному снижению плотности CD4-рецепторов на клеточной мембране Т-хелперов всех классов по сравнению с контролем, то по завершению ПГП наблюдалась противоположная тенденция по увеличению данного показателя. В то же время, 10-дневные ГТ контрольных крыс приводили к увеличению суммарной плотности $CD8^+$ клеток в лимфоидных фолликулах селезенки на 15% ($p<0,05$) *(рис.1А)* за счет увеличения количества $CD8^+$-малых лимфоцитов (на 45%, $p<0,05$), при этом наблюдалось снижение плотности CD8-рецепторов на клеточной мембране цитотоксических лимфоцитов всех классов на 8–14% ($p<0,05$), по сравнению с контролем. По завершении 10-дневного ПГП отмечалось еще более выраженное увеличение суммарной плотности $CD8^+$ клеток (на 46%, $p<0,05$), по сравнению с контрольной группой животных, обусловленное увеличением количества (на 77% $p<0,05$) $CD8^+$-лимфобластов и их процентной доли в структуре популяции (на 21% $p<0,05$), при этом плотность CD8-рецепторов на клеточной мембране преимущественно повышалась.

ГТ контрольных крыс приводили к однонаправленному увеличению суммарной плотности $Bcl\text{-}2^+$-клеток (на 27%, $p<0,05$) и $p53^+$-клеток (на 39%, $p<0,05$) преимущественно за счет увеличения количества $Bcl\text{-}2^+$-малых лимфоцитов (на 55%, $p<0,05$) и $p53^+$-малых лимфоцитов (на 81%, $p<0,05$). При этом концентрации белков Bcl-2 и p53 в иммунопозитивных лимфоцитах преимущественно снижались, по сравнению с контролем. Характерно, что данная тенденция по возрастанию плотности популяции Bcl-2- и $p53^+$-клеток не только сохранялась, но и увеличивалась по завершении 10-дневного ПГП (на 39% и 53% соответственно, $p<0,05$) *(рис. 1А)*.

ГТ контрольных крыс приводили к увеличению суммарной плотности $МНС\text{-}2^+$клеток в лимфоидных фолликулах селезенки (на 30%, $p<0,05$) за счет увеличения плотности популяции $МНС\text{-}2^+$-В лимфоцитов (на 62%, $p<0,05$) и не влияли на количество пролиферирующих $PCNA^+$-лимфоцитов. По истечении 10-дневного ПГП количество $МНС\text{-}2^+$-клеток начало возвращаться к уровню контрольных показателей, тогда как плотность популяции делящихся лимфоцитов увеличивалась на 29% ($p<0,05$), по сравнению с контрольной группой животных *(рис. 1А)*.

ГТ крыс с ЭСД (28 дней) сопровождались уменьшением суммарной плотности $CD4^+$-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки на 15% ($p<0,05$) и увеличивали плотность CD4-рецепторов на клеточной мембране Т-хелперов всех классов по сравнению с контрольной группой диабетических животных, тогда как по завер-

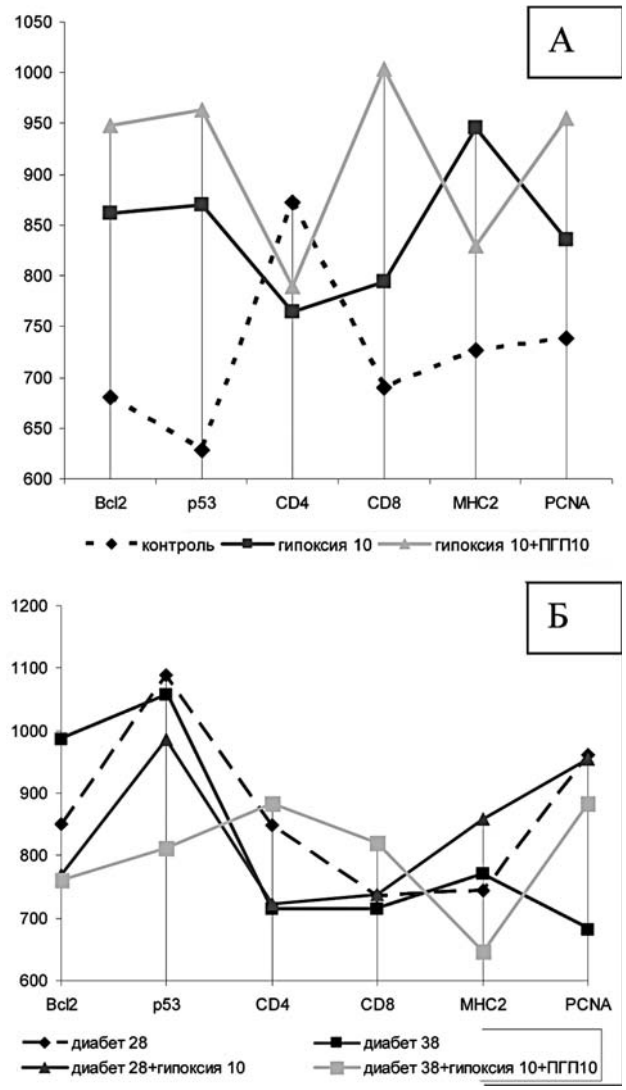

Рис. 1. Влияние ГТ контрольных (А) и диабетических (Б) крыс на количество (на 1 мм^2) лимфоцитов различного фенотипа в лимфоидных фолликулах селезенки.

шении 10-дневного ПГП не наблюдалось достоверного изменения количества $CD4^+$-клеток, по сравнению с диабетическими крысами (38 дней). При этом уменьшалась плотность CD4-рецепторов на клеточной мембране у $CD4^+$- малых, средних и больших лимфоцитов. ГТ диабетических крыс (28 дней) и 10-дневный ПГП не приводили к достоверным изменениям суммарной плотности $CD8^+$-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки *(рис. 1Б)*. ГТ крыс с ЭСД (28 дней) также не приводили к достоверным изменениям суммарной плотности $Bcl\text{-}2^+$- и $p53^+$-клеток, по сравнению с группой диабетических животных (28 дней), тогда как после завершения ПГП их количество достоверно снижалось на 23% ($p<0,05$) *(рис. 1Б)*.

ГТ диабетических крыс (28 дней) сопровождались увеличением суммарной плотности МНС-2^+-клеток в лимфоидных фолликулах селезенки на 15% ($p<0,05$) за счет возрастания количества МНС-2^+-В-лимфоцитов (на 20%, $p<0,05$), по сравнению с контрольной группой диабетических животных. При этом плотность МНС-II-рецепторов на мембране всех классов АПК после ГТ также достоверно увеличилась, по сравнению с контролем. В тоже время, по истечению 10-дневного ПГП наблюдалась противоположная тенденция – общее количество МНС-2^+-клеток уменьшалось на 16% ($p<0,05$), по сравнению с диабетическими крысами (38 дней) *(рис. 1Б)*. Суммарная плотность $PCNA^+$-клеток в результате ГТ диабетических крыс не изменялась, тогда как после завершения ПГП наблюдалось увеличение количества пролиферирующих лимфоцитов на 30% ($p<0,05$), по сравнению с диабетическими крысами (38 дней).

Выводы

1. ГТ контрольных крыс оказывают однонаправленный эффект по увеличению количества $CD8^+$-лимфоцитов, клеток, экспрессирующих анти- и проапоптотические белки Bcl-2 и p53, МНС-2^+клеток и не влияют на плотность популяции пролиферирующих и $CD4^+$клеток в лимфоидных фолликулах белой пульпы селезенки. Характерно, что увеличение количества лимфоцитов соответствующего фенотипа в результате ГТ вызвано, главным образом, возрастанием плотности популяции зрелых малых $CD8^+$-, $Bcl\text{-}2^+$-, $p53^+$-клеток, а также МНС-2^+-В-лимфоцитов. Обнаруженные изменения сопровождаются снижением плотности CD8-рецепторов на клеточной мембране, а также концентрации белков Bcl-2 и p53 в иммунопозитивных лимфоцитах. При этом выявленные эффекты по истечению 10-дневного ПГП не только не уменьшаются, но и имеют тенденцию к нарастанию (за исключением АПК), что свидетельствует о длительности морфофункциональных изменений, вызываемых гипоксией, и их отсроченности.

2. ГТ диабетических крыс оказывают менее значительный эффект: приводят к уменьшению количества $CD4^+$-клеток, увеличению МНС-2^+-клеток и не влияют на плотность популяции цитотоксических, пролиферирующих лимфоцитов, $Bcl\text{-}2^+$- и $p53^+$- клеток. Тем не менее, и в данном случае наблюдается отсроченность эффектов гипоксии, – по завершении ПГП изменения более выражены: снижается суммарная плотность $Bcl\text{-}2^+$-, $p53^+$- и МНС-2^+-клеток, возрастает количество пролиферирующих лимфоцитов.

Литература

1. *Walmsley S.* Hypoxia, hypoxia inducible factor and myeloid cell function / Walmsley S., Chilvers E., Whyte M. // Arthritis Res. Ther. – 2009. – Vol. 11. – P. 219.
2. *Китаев М.И.* Гипоксия и иммунитет / Китаев М.И. // Гипоксия. Адаптация, патогенез и клиника. – 2000. – С. 307–333.
3. *Колесник Ю.М.* Влияние гипоксической гипоксии на состояние эндокринной функции поджелудочной железы / Колесник Ю.М., Абрамов А.В. // Физиол. журн. – 1992. – Т. 38, №3. – С. 60–62.
4. *Johnson D.* Acute Hypoxia Activates the Neuroimmune System, Which Diabetes Exacerbates / Johnson D., O'Connor J., Hartman M. // The J. of Neurosc. – 2007. – Vol. 27. – P. 1161–1166.
5. *Oliver K.* Hypoxia Regulation of NF-κB signalling during inflammation: the role of hydroxylases / Oliver K., Taylor C., Cummins P. // Arthritis Res. Ther. – 2009. – Vol. 11. – P. 215.
6. *Eltzschig H.* Hypoxia Signaling and Nf-κB / Eltzschig H., Carmeliet P. // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 364. – P. 656–665.
7. *Nizet V.* Interdependence of hypoxic and innate immune responses / Nizet V., Johnson R. // Nat. Rev. Immun. – 2009. – Vol. 9. – P. 609–617.

Сведения об авторе:
Гриневич И.В., ассистент каф. патологической физиологии ЗГМУ.
Адрес для переписки:
Гриневич Инна Владимировна. 69035, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26, ЗГМУ.
Тел.: (061) 233 64 65.