

О. В. Сивоконюк

ИММУНОМОРФОЛОГИЯ ОРГАНОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО И ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ИММУНОГЕНЕЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Одесский государственный медицинский университет

Иммунная система — высокоспециализированная, сложно регулируемая структура, клеточные элементы которой находятся в состоянии постоянной пролиферации. Как известно, до 5 мес эмбриогенеза плода человека печень является основным органом гемопоэза и по многим показателям определяет гистогенез лимфоидной ткани. Печень взрослого человека не участвует в кроветворении, но она — жизненно важный, многофункциональный орган. Одна из его функций — защитная — имеет прямое отношение к деятельности лимфоидной системы [1]. По данным литературы, практически любая интоксикация в той или иной степени может стать причиной нарушения иммунного статуса организма [2–5]. Патология печени сопряжена с активацией гуморального и клеточного иммунитета, но иногда сопровождается подавлением иммунной функции, особенно Т-клеточной системы.

Изучению функционального состояния иммунной системы при экспериментальном токсическом гепатите посвящено много исследований. При токсическом поражении печени происходят существенные нарушения в органах иммунной системы, которые сопровождаются подавлением иммунного ответа [4–6].

Вместе с тем, в вышеуказанных работах не дана оценка иммуноморфологических изменений в органах центрального (тимус) и периферического (селезенка, мезентериальные лимфатические узлы) иммуногенеза.

Введение экспериментальным животным четыреххлористого углерода (CCl_4) вызывает неспецифический реактивный гепатит. Ранее проведенные нами исследования [7–9] в динамике показали, что пик морфогистохимических изменений приходится на 3-и сутки острого токсического гепатита. Именно этот временной промежуток был избран нами для исследований, результаты которых изложены в данной работе.

Целью настоящей работы явилось иммуногистохимическое исследование основных клонов иммунных клеток, располагающихся в центральных (тимус) и периферических органах (селезенка и мезентериальные лимфатические узлы) иммуногенеза, и степень выраженности апоптоза в

условиях острого химического повреждения печени CCl_4 .

Материалы и методы исследования

Опыты проводили на 60 белых крысах линии Вистар массой 180–250 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария в условиях свободного передвижения и доступа к воде. Работу с лабораторными животными проводили с соблюдением общепринятых нормативных и биолого-этических требований.

Были сформированы следующие опытные группы: а) интактные животные (контроль); б) животные с острым токсическим гепатитом.

Острый токсический гепатит (ОТГ) вызывали однократным внутривенным введением 50%-го масляного раствора CCl_4 в дозе 5 мл / 1000 г. Животных выводили из эксперимента на 3-и сутки путем декапитации под легким эфирным наркозом. После фиксации в 10%-м растворе нейтрального формалина и спиртовой проводки кусочки тимуса, селезенки и брыжеечных лимфатических узлов заливали в целлоидин-парафин, изготавливали срезы толщиной 5–6 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону.

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах непрямым методом Кунса по методике Brosnan (1979). Иммунные клетки дифференцировали с помощью крысиных моноклональных антител (МКА) к различным типам клеток фирмы Serotec. Использовали следующие маркеры: CD95, CD8, CD4, CD3, CD45RA, ED1, IgA, IgM, IgG, C3 фракция комплемента. В качестве люминесцентной метки использовали F(ab)-2 — фрагменты кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных ФИТЦ. Препараты изучали в люминесцентном микроскопе МЛ-2 с использованием светофильтров: ФС-1-2, СЗС-24, БС-8-2, УФС-6-3. Относительные объемы основных клонов иммунных клеток определяли с помощью сетки Г. Г. Автадилова [13] в люминесцентном микроскопе. Апоптотный индекс рассчитывал следующим образом: среднее количество клеток в поле зрения, умноженное на 400, принимали за 100 %; среднее количество клеток, экспрессирующих рецепторы CD95 в поле зрения, умноженное на 400, прини-



мали за X; X = среднее количество клеток, экспрессирующих рецепторы CD95 в поле зрения, умноженное на 400, умноженное на 100, делим на среднее количество клеток в поле зрения, умноженное на 400. Цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты исследований и их обсуждение

Иммуногистохимическое исследование позволило выявить в тимусе интактных животных разные клоны иммунных клеток. Преобладали Т-лимфоциты, а именно CD3⁺, как известно, представляющие собой общую популяцию Т-лимфоцитов (рис. 1). В обеих зонах тимуса среди них были выявлены как CD4⁺-Т-хелперы, так и CD8⁺-Т-супрессоры. Относительные объемы иммунных клеток в лимфоидном компоненте тимуса определяли, не выделяя отдельно показатели для коры и мозгового вещества. Результаты исследования приведены в табл. 1. Соотношение CD4⁺/CD8⁺ составило 1,8.

Кроме Т-лимфоцитов в тимусе отмечались также клетки, экспрессирующие рецепторы к ED1⁺ (макрофаги и естественные киллеры), а также не-

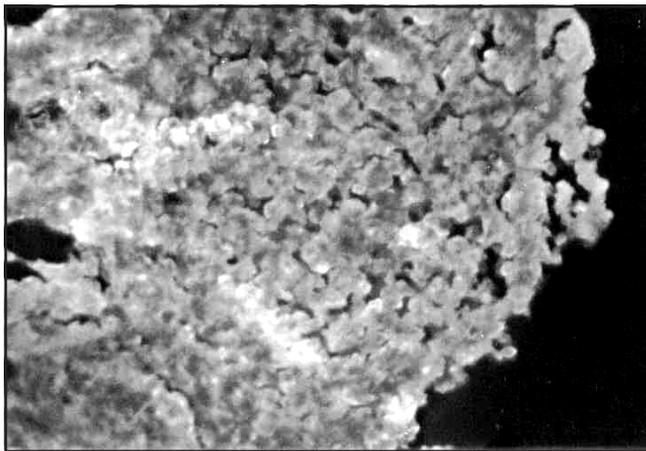


Рис. 1. Обилие CD3 лимфоцитов в тимусе контрольного животного. Непрямой метод Кунса с МКА CD3. × 120

многочисленные В-лимфоциты (CD45RA⁺) и клетки-продуценты иммуноглобулинов IgM и IgG. Не отмечались клетки-продуценты IgA и С3-фракции комплемента. Если макрофаги (ED1⁺) располагались диффузно по всей паренхиме долек тимуса, то иммунобласты, также как и В-лимфоциты, локализовались преимущественно в периваскулярных пространствах. Соотношение CD3⁺/ED1⁺/CD45RA⁺ оказалось равным 20,0 : 2,5 : 1,0. Апоптотный индекс тимоцитов в группе контроля составил (23,0 ± 2,5) %.

При экспериментальном токсическом гепатите в органах иммунной системы наблюдаются выраженные гемодинамические и дистрофические нарушения. Наряду с этим, в тимусе отмечаются инволютивные изменения: диффузно-очаговое опустошение коркового слоя, размывание границ между корковым и мозговым слоями, увеличение числа телец Гассалля и появление их в корковом слое на 7-е сутки эксперимента [8–10]. С увеличением сроков развития гепатита усиливалась акцидентальная трансформация тимуса — неспецифическая реакция, развивающаяся на фоне общего адаптационного синдрома, в котором основную роль играют глюкокортикостероиды [10–12]. Опустошение коркового слоя тимуса, вероятно, обусловлено нарастающей гибелью кортизончувствительных лимфоцитов, локализующихся преимущественно в субкапсулярной зоне. Увеличение количества телец Гассалля и их нетипичное распределение в тимусе может быть результатом нарушения коммуникаций эпителиальных клеток с тимоцитами или токсического воздействия CCl₄ на эпителий тимуса как непосредственного, так и опосредованного через элементы цитокинового каскада [10–12].

На 3-и сутки ОТГ наблюдается, по сравнению с контролем, дефицит Т-лимфоцитов как в коре, так и в мозговом веществе тимуса животных с токсическим гепатитом. Несмотря на это, среди основных клонов иммунных клеток, как и в группе контроля, в ткани тимуса преобладали Т-лимфоциты (CD3⁺). При этом, в обеих зонах

Таблица 1

Относительные объемы основных клонов иммунных клеток в тимусе животных с токсическим гепатитом (Ме (25 %; 75 %))

Группа	Относительные объемы основных клонов иммунных клеток, %							
	CD3	Отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов		ED1	CD45RA	Отдельные субпопуляции клеток-продуцентов иммуноглобулинов		
		CD4	CD8			IgM	IgG	С-3ФК
Контроль	82,0 (55,5; 100,0)	65,0 (46,0; 79,5)	35,0 (22,0; 47,0)	10,0 (6,0; 14,0)	4,0 (2,5; 6,0)	2,5 (1,5; 3,0)	1,0 (1,0; 2,0)	—
ОТГ	50,0 (32,0; 69,0)*	55,0 (41,0; 69,0)*	45,0 (33,0; 57,0)*	27,0 (22,0; 33,0)*	13,0 (9,0; 17,0)*	3,5 (2,5; 4,5)	4,5 (3,5; 5,5)*	1,0 (1,0; 2,0)*

Примечание. В табл. 1–4: * — P<0,05 по сравнению с контролем.



тимуса выявлялись как CD4⁺-Т-хелперы, так и CD8⁺-Т-супрессоры. Однако относительные объемы этих клонов клеток в дольках тимуса значительно отличались от контрольных показателей (см. табл. 1). Соотношение CD4⁺/CD8⁺ уменьшилось по сравнению с контролем и приблизилось к 1 (контрольный показатель 1,8).

Так же, как и в контрольной группе, кроме Т-лимфоцитов в обеих зонах долек тимуса находились клетки, экспрессирующие рецепторы к ED1⁺ (макрофаги и естественные киллеры), а также В-лимфоциты (CD45RA⁺) и клетки-продуценты иммуноглобулинов — IgM и IgG. Кроме того, увеличилась популяция клеток-продуцентов С3-фракции комплемента, тогда как продуценты IgA не выявлялись. Макрофаги (ED1⁺) отмечались диффузно по всей паренхиме долек тимуса, а В-лимфоциты и плазмобласты располагались преимущественно в периваскулярных пространствах. Соотношение CD3⁺/ED1⁺/CD45RA⁺ оказалось равным 3,8:2,0:1,0 (в контроле — 20,0:2,5:1,0), за 1 принимается показатель CD45RA⁺. Вышеуказанный показатель подтверждает значительное снижение относительного объема Т-клеток в тимусе животных с токсическим поражением печени на фоне достоверного увеличения макрофагальной активности и В-лимфоидного компонента за счет опустошения лимфоидной популяции, оголения стромы, ретикулоэпителиального компонента железы, экспрессирующего рецепторы к ED1⁺. Увеличение этой популяции обусловлено миграцией макрофагов из крови в тимус в условиях усиленного апоптоза тимоцитов. Последнее подтверждается анализом апоптозного индекса, который составил (32,0±3,6) % и достоверно превысил контрольный показатель.

Иммуногистохимическое исследование ткани селезенки контрольных животных подтвердило известную зональность в расположении Т- и В-лимфоцитов. Преимущественно в периартериальных зонах фолликулов располагались Т-лимфоциты (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), тогда как в светлых центрах фолликулов и их мантийных зонах преимущественно определялись В-лимфоциты (CD45RA⁺). В красной пульпе селезенки регист-

рировались как В-, так и Т-лимфоциты. Во всех зонах органа определялись макрофаги (ED1⁺). Преимущественно в В-зонах отмечались клетки-продуценты иммуноглобулинов, а именно IgM и IgG. Для количественной оценки основных клонов иммунных клеток нами определялись относительные объемы этих клеток на серийных срезах, обработанных соответствующими МКА. Результаты этих исследований представлены в табл. 2. Соотношение CD4⁺/CD8⁺ составило 3,0. Соотношение CD3⁺/ED1⁺/CD45RA⁺ оказалось равным 2,7 : 1,0 : 4,5. Апоптозный индекс лимфоцитов составил (33,0±2,0) %.

На 3-и сутки ОТГ в селезенке отмечаются выраженные пролиферативные и гиперпластические процессы с присоединением макрофагально-плазмочитарной реакции [8–10]. При иммуногистохимическом исследовании так же, как и в группе контроля, сохранялась зональность расположения Т- и В-лимфоцитов. По сравнению с контрольной группой практически не изменился относительный объем Т-лимфоцитов, популяция макрофагов значительно увеличилась, а относительный объем В-лимфоцитов уменьшился. При этом соотношение CD3⁺/ED1⁺/CD45RA⁺ составило 1,5 : 1,0 : 2,0 (контрольный показатель — 2,7 : 1,0 : 4,5). Среди плазмобластов возросла популяция клеток, продуцирующих IgM, и клеток, экспрессирующих поверхностные рецепторы к С3-фракции комплемента (см. табл. 2), относительный объем плазмобластов, продуцирующих IgG, несколько снизился. Среди Т-лимфоцитов относительно увеличилась популяция Т-супрессоров (CD8⁺) и соответственно уменьшилось количество Т-хелперов (CD4⁺), поэтому значительно снизилось соотношение CD4⁺/CD8⁺, составив 1,8 (контрольный показатель — 3,0). Апоптозный индекс лимфоцитов составил (39,0±3,2) %, что достоверно выше контроля.

Иммуногистохимическое исследование в корковом слое лимфатических узлов выявило преобладание В-лимфоцитов (CD45RA⁺), тогда как в паракортикальной зоне отмечались преимущественно Т-лимфоциты (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺). В моз-

Таблица 2

Относительные объемы основных клонов иммунных клеток в селезенке животных с токсическим гепатитом (Ме (25 %; 75 %))

Группа	Относительные объемы основных клонов иммунных клеток, %							
	CD3	Отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов		ED1	CD45RA	Отдельные субпопуляции клеток-продуцентов иммуноглобулинов		
		CD4	CD8			IgM	IgG	С-3ФК
Контроль	33,0 (30,0; 36,0)	75,0 (50,0; 98,0)	25,0 (15,0; 35,0)	12,0 (8,0; 16,0)	55,0 (49,0; 61,0)	12,0 (9,0; 15,0)	16,0 (12,0; 20,0)	2,0 (1,0; 3,0)
ОТГ	34,0 (28,0; 40,0)	65,0 (38,0; 86,0)*	35,0 (29,0; 41,0)*	22,0 (19,0; 26,0)*	44,0 (40,0; 48,0)*	13,0 (9,0; 16,0)	14,0 (9,0; 19,0)	5,5 (2,0; 9,0)*



Относительные объемы основных клонов иммунных клеток в брыжеечных лимфатических узлах животных с токсическим гепатитом (Ме (25 %; 75 %))

Группа	Относительные объемы основных клонов иммунных клеток, %							
	CD3	Отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов		ED1	CD45RA	Отдельные субпопуляции клеток-продуцентов иммуноглобулинов		
		CD4	CD8			IgM	IgG	С-3ФК
Контроль	57,0 (48,0; 63,0)	73,5 (56,0; 90,0)	27,0 (25,0; 29,0)	8,5 (4,0; 18,0)	33,0 (26,0; 40,0)	6,0 (4,0; 8,0)	9,5 (7,0; 11,0)	0,6 (0,5; 0,7)
ОТГ	44,5 (38,0; 49,0)*	66,0 (52,0; 80,0)*	33,5 (33,0; 35,0)*	26,0 (20,0; 32,0)*	30,0 (25,0; 35,0)	18,5 (15,0; 20,0)*	32,5 (18,0; 37,0)*	6,5 (6,0; 7,0)*

говом веществе локализовались как Т-, так и В-лимфоциты с преобладанием первых. Макрофаги (ED1⁺) определялись во всех морфофункциональных зонах лимфатического узла, клетки-продуценты IgM и IgG преимущественно выявлялись в коре и мозговом веществе.

Результаты количественной оценки основных клонов иммунных клеток в виде их относительных объемов представлены в табл. 3. Соотношение CD4⁺/CD8⁺ составило 2,7, а соотношение CD3⁺/ED1⁺/CD45RA⁺ оказалось равным 4,5 : 1,0 : 2,8. Такое соотношение основных клонов иммунных клеток в лимфатическом узле крысы подобно таковому в лимфатическом узле человека [1]. По нашим данным, в лимфатическом узле крысы группы контроля также преобладают Т-лимфоциты, составляющие 55,0 %, а количество В-лимфоцитов несколько выше — 33,0 %. Апоптотный индекс лимфоцитов составил (16,0±1,0) %.

Так же, как и в группе контроля, на 3-и сутки ОТГ в ткани лимфатических узлов сохранялась зональность расположения Т- и В-лимфоцитов. Макрофагальная реакция усилена и макрофаги (ED1⁺) определялись во всех зонах лимфатического узла (рис. 2). Несколько усилена и реакция плазматизации, в первую очередь, вслед-

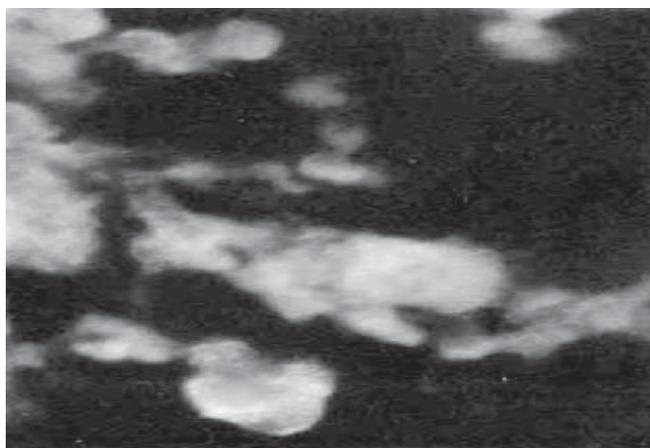


Рис. 2. Обилие макрофагов в лимфатическом узле животного с токсическим гепатитом. Непрямой метод Кунса с МКА ED1. × 900

ствие увеличения популяции IgG -продуцирующих клеток (см. табл. 3). Соотношение CD4⁺/CD8⁺ меньше по сравнению с контролем и составляет 1,6 (в контроле 2,7). Соотношение CD3⁺/ED1⁺/CD45RA⁺ оказалось 1,7 : 1,0 : 1,1 (в контроле 2,2 : 1,0 : 1,2), что указывает на относительное увеличение макрофагальной популяции.

Обращает на себя внимание достоверное увеличение степени выраженности апоптоза в лимфоидном компоненте лимфатических узлов при токсическом гепатите. Апоптотный индекс лимфоцитов составил (25,0±3,0) % (табл. 4).

Токсическое поражение печени четырехклеточным углеродом приводит к усилению гуморального и макрофагального звеньев иммунитета и угнетению клеточного звена. Ранее полученные результаты патоморфологических исследований печени, органов центрального (тимус) и периферического иммуногенеза (селезенка и мезентериальные лимфатические узлы) в сочетании с данными иммуногистохимических исследований расширяют возможность использования данной модели для доклинической оценки иммуномодулирующих и гепатопротекторных свойств фармакологических препаратов.

1. При ОТГ в ткани тимуса наблюдается снижение популяции Т-лимфоцитов, в частности Т-хелперов, и уменьшение хелперно-супрессорного индекса, а также увеличение количества В-лимфоцитов, плазмобластов и появление С3-фракции комплемента.

Таблица 4

Апоптотный индекс клеточных элементов печени и органов иммунной системы, %

Группа	Апоптотный индекс, %			
	Печень	Тимус	Селезенка	Лимфатический узел
Контроль	4,0±0,5	23,0±2,5	33,0±2,0	16,0±1,0
ОТГ	15,0±2,0*	32,0±3,6*	39,0±3,2*	25,0±3,0*



2. При ОТГ в ткани селезенки виявляються признаки активизації макрофагального звена імунітету в формі збільшення кількості макрофагів в різних функціональних зонах селезенки. Змінення со сторони Т-клітинної популяції селезенки проявляються зменшенням хелперно-супресорного індексу. Збільшена популяція клітин-продуцентів С3-фракції комплексу, тоді як популяція клітин-продуцентів IgM і IgG суттєво не змінилась.

3. При ОТГ в лімфатических вузлах виявляються признаки активизації макрофагального і гуморального звеньїв імунітету в формі збільшення кількості макрофагів і плазматических клітин в різних функціональних зонах вузлів. Виражені змінення со сторони Т-клітинної популяції, проявляючієсьь відносительним обедненням Т-зони, с одної сторони, і зменшенням хелперно-супресорного індексу, с другої сторони, на фоні вищеуказаної активації макрофагального і гуморального імунігенезу, свідечать о дисбалансі основних звеньїв імунітету.

4. Отримані дані будуть використані в якості порівняння при вивченні іммуногістохіміческих особливостей печінки і органів імунної системи на фоні ОТГ при використанні нового координаційного з'єднання германію с нікотинівою кислотою (МИГУ-1) в порівнянні с відомими гепатопротекторами — есенціалом і гептралом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хлыстова З. С. Становление системы иммуногенеза плода человека. — М.: Медицина, 1987. — 254 с.

2. Лазарева Г. А., Бровкина И. Л. Протекторное действие регуляторов энергетического обмена и эссенциале при нитритном поражении // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 2006. — № 2. — С. 21-23.

3. Матвеева Л. В., Новикова Л. В., Мосина Л. М. Клинико-иммунологические особенности больных хроническим алкогольным гепатитом // Современ. аспекты теор. и клин. мед. — 2003. — № 2. — С. 70-73.

4. Утешев Б. С., Прокопенко Л. Г., Конопля Е. Н. Лидокаин как иммуномодулятор при токсическом поражении печени // Эксперим. и клин. фармакология. — 1997. — Т. 60, № 2. — С. 45-48.

5. Иммунология и иммунопатология пищеварительной системы / Ю. И. Бажора, В. И. Кресюн, К. Л. Сервецкий, И. Н. Годзиева. — Одесса: ОКФА, 2001. — 190 с.

6. Шевченко І. М., Пашолок С. П. Функціональний стан імунної системи при експериментальному токсичному гепатиті // Одес. мед. журнал. — 2004. — № 5 (85). — С. 23-26.

7. Сивоконюк О. В. Імуноморфологія токсичного гепатиту на фоні корекції гепатопротекторами // Одес. мед. журнал. — 2003. — № 6 (80). — С. 34-36.

8. Сивоконюк О. В. Патоморфологія органів імунігенезу при дії гепатопротекторів в умовах токсичного ураження // Одес. мед. журнал. — 2004. — № 3 (83). — С. 25-27.

9. Сивоконюк О. В. Патоморфологія органів імунігенезу при експериментальному токсичному гепатиті // Запоріж. мед. журнал. — 2005. — № 3. — С. 119.

10. Динаміка морфофункціональних змін органів імунної системи мишей BALB/c при експериментальному гепатиті / С. С. Оберніхін, О. В. Макарова, В. В. Малайцев і др. // Бюл. експерим. біології і медицини. — 2006. — Т. 141, № 4. — С. 451-454.

11. Гаркаві Л. Х., Квакіна Е. Б., Кузьменко Т. С. Адаптаційні реакції і активаційна терапія. — М., 1998. — 665 с.

12. Радченко О. М. Кореляційні зв'язки між морфологічними показниками імунікомпетентних органів, надниркових залоз і клітинами периферичної крові при різних типах адаптаційних реакцій в експерименті // Фізіол. журнал. — 2000. — Т. 46, № 3. — С. 22-25.

13. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. — М.: Медицина, 1990. — 383 с.

УДК 616.24-002:616.151

Т. І. Тюпка, А. І. Березнякова

ВПЛИВ ЕНАПУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ТКАНИН ЛЕГЕНЬ І МІОКАРДА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГЕМОДИНАМІЧНОМУ НАБРЯКУ ЛЕГЕНЬ

Національний фармацевтичний університет, Харків

Вступ

Проблема набряку легень дотепер залишається актуальною, оскільки ця патологія є ускладненням багатьох серцево-судинних захворювань: мітральних і аортальних пороків, гіпертонічної хвороби, стенокардії, інфаркту міокарда, перикардиту, атеросклерозу та ін. Незважаючи на значну кількість праць,

опублікованих як у вітчизняній, так і в іноземній літературі, багато сторін патогенезу цього захворювання вивчені недостатньо. Цим, значною мірою, визначається низька ефективність методів лікування, які застосовують у практичній медицині. Разом із тим, аналіз даних літератури щодо механізмів розвитку набряку легень дозволив нам зробити припущення про мож-

ливість ефективного застосування інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) з метою корекції гемодинамічних розладів, які виникають при цій патології [1; 2].

У зв'язку з викладеним, метою даної роботи стало вивчення впливу інгібітора АПФ — енапу (KRKA, Slovenia) на морфофункціональний стан тканини легень і міокарда при екс-

