

Антоніо Б. А. Шивінда Едуардо, І. Г. Калиновська

Імуноморфологічні зміни в лімфатичних вузлах і селезінці щурів, сенсibilізованих фактором переносу

Исучены изменения в плюсовом мякише и лимфоидных органах крыс, сенсibilизированных фактором переноса (ФП), после внутрикожного введения антигена. Установлено, что каждая реакция развивается по типу замедленной гиперчувствительности. Гистологические изменения в плюсовом мякише опытных крыс коррелируют с изменением клеточного состава подколенных лимфатических узлов. Увеличение количества лимфобластов в селезёнке опытных крыс свидетельствует о том, что ФП стимулирует лимфоцитопоез, а увеличение количества плазмочитов — о стимуляции факторов гуморального иммунитета.

Імунні реакції відбуваються в периферичних органах кровотворення та імунного захисту. До них відносяться селезінка, лімфатичні вузли, лімфоїдні утвори різних органів організму. Існує функціональний взаємозв'язок компонентів імунної системи, який забезпечує єдину відповідь на антигенну стимуляцію. В літературі описані процеси імунологічної перебудови лімфоїдних органів при сенсibilізації різними антигенами [5, 7, 8] та хімічними речовинами [1]. Дані авторів [4, 10–14], які вивчали ФП, свідчать про те, що з його допомогою можна в найкоротші строки здійснити сенсibilізацію реципієнтів антигеном, до якого донор був чутливим. Мета нашого дослідження — проаналізувати гістологічні зміни, що відбуваються в плесновому м'якуші, та зміни цитологічного складу підколінного лімфовузла й селезінки щурів, сенсibilізованих ФП, під час розвитку імунної реакції на внутрішньошкірне введення гомологічного антигену.

Методика

Досліди проведені на 69 безпородних білих щурах-самцях масою 100–120 г, яких було розподілено на 3 групи: дві дослідні та одну контрольну. Щурам I дослідної групи підшкірно вводили ФП, специфічний до *Salmonella typhimurium* (отриманий із лімфовузла бичка, сенсibilізованого сальмонельозним антигеном), в дозі 4 ум. од. (1 ум. од. еквівалентна $5 \cdot 10^6$ лейкоцитів). Через 3 доби щурам ставили шкірну пробу: в лівий плесновий м'якуш вводили по 0,125 мл сальмонельозного антигену, а в правий — стерильний фізіологічний розчин у такому ж об'ємі. Одночасно аналогічну пробу ставили і щурам II дослідної групи, яким попередньо ФП не вводили. Результат враховували кожну добу протягом 10 діб. Позитивним результатом вважали потовщення плеснового м'якуша через 1–3 доби, достовірне відносно контролю, а також обчисленням коефіцієнта потовщення [9]. Щурам III групи (контрольної) ФП не вводили і шкірну пробу не ставили.

© Антоніо Б. А. Шивінда Едуардо, І. Г. Калиновська

Інтактних щурів (ІІІ група) умертвляли за допомогою ефіру. У них видаляли підколінні лімфовузли та селезінку для цитоморфологічних досліджень, а також відбирали шматочки плеснового м'якуша для гістологічних досліджень [6]. Такі ж дослідження провели й у щурів дослідних груп, котрих забивали через 1, 2, 3, 6 і 10 діб після постановки шкірної проби.

Цитоморфологічні дослідження проводили на препаратах-відбитках, які забарвлювали за Папенгеймом [2]. Зміни цитологічного складу паренхіми лімфовузла та селезінки у дослідних щурів оцінювали порівнюючи з показниками інтактних тварин, які вважали вихідними.

Результати та їх обговорення

Щури реагували на внутрішньошкірне введення антигену потовщенням плеснового м'якуша. Максимальну його товщину у тварин дослідних груп зафіксовано через 1 добу. Так, у щурів І групи товщина лівого плеснового м'якуша була $4,445 \text{ мм} \pm 0,076 \text{ мм}$, а правого — $3,688 \text{ мм} \pm 0,045 \text{ мм}$, у той час, як у тварин ІІ групи $3,967 \pm 0,039$ і $3,573 \text{ мм} \pm 0,026 \text{ мм}$ відповідно. Коефіцієнт потовщення був 0,14. При гістологічному дослідженні плеснового м'якуша щурів І групи виявлено незначне набрякання його основи та підшкірного шару, а також інфільтрацію їх лейкоцитами і макрофагоцитами (гістіоцитами). Серед лейкоцитів переважно були нейтрофільні гранулоцити і у меншій кількості лімфоцити. У щурів ІІ групи набряк основи м'якуша був менш виражений. Вогнища клітинної інфільтрації виявлялися переважно навколо судин і складалися з мононуклеарів, нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів.

Через 2 доби товщина плеснового м'якуша у щурів І і ІІ груп почала поступово зменшуватись. Їх гістологічна картина мало відрізнялася від такої через 1 добу. Проте клітинний склад інфільтрату у щурів І групи дещо змінився: кількість нейтрофільних гранулоцитів зменшилася, а лімфоцитів і гістіоцитів — збільшилася. У щурів ІІ групи склад інфільтрату залишався незмінним.

Через 3 доби набряк основи м'якуша зменшився, але інфільтрація її глибоких шарів ще зберігалася. Клітини були представлені переважно лімфоцитами і в незначній кількості нейтрофільними гранулоцитами. В ІІ групі щурів клітинний інфільтрат містив велике число нейтрофільних гранулоцитів. Товщина плеснового м'якуша у цих тварин наблизилася до вихідного значення через 5 діб, а у щурів І групи — через 10 діб. Їх гістоструктура також майже не відрізнялася від вихідної.

Зміни в цитограмі підколінних лімфатичних вузлів щурів корелювали з розвитком змін у плесновому м'якуші. Клітинний склад паренхіми лімфатичних вузлів інтактних щурів виглядав так: лімфоцити — $95,84 \% \pm 0,32 \%$; плазмоцити — $1,83 \% \pm 0,16 \%$; макрофагоцити — $1,03 \% \pm 0,16 \%$; нейтрофільні гранулоцити — $0,33 \% \pm 0,07 \%$; еозинофільні гранулоцити — $0,77 \% \pm 0,13 \%$ і базофільні гранулоцити — $0,2 \% \pm 0,05 \%$.

Через 1 добу в лімфовузлах щурів І групи порівняно зі значеннями інтактних тварин (ІІІ група) спостерігалася значне збільшення кількості нейтрофільних гранулоцитів (до $7,725 \% \pm 1,52 \%$, $P < 0,01$), а також макрофагоцитів ($2,3 \% \pm 0,66 \%$), плазмоцитів ($2,575 \% \pm 0,45 \%$) і базофільних

гранулоцитів ($0,6 \% \pm 0,13 \%$, $P < 0,05$). Кількість лімфоцитів та еозинофільних гранулоцитів навпаки дещо зменшилася і становила $86,325 \pm 1,87$ ($P < 0,001$) та $0,475 \% \pm 0,08 \%$ відповідно.

У лімфатичних вузлах щурів II групи через 1 добу різко збільшилося число гранулоцитів — еозинофільних ($2,6 \% \pm 0,26 \%$, $P < 0,001$), базофільних ($1,533 \% \pm 0,24 \%$, $P < 0,05$) та нейтрофільних ($6,0 \% \pm 0,89 \%$, $P < 0,001$), а також макрофагоцитів ($1,833 \% \pm 0,29 \%$, $P < 0,05$). Кількість лімфоцитів і плазмоцитів зменшилася і становила $86,7 \% \pm 1,98 \%$ ($P < 0,01$) і $1,334 \% \pm 0,28 \%$ відповідно.

Через 2 доби в лімфатичних вузлах щурів I групи зареєстровано максимальну кількість плазмоцитів — $4,38 \% \pm 0,42 \%$ ($P < 0,001$). Число макрофагоцитів продовжувало збільшуватись і становило $2,5 \% \pm 0,52 \%$ ($P < 0,05$), а нейтрофільних гранулоцитів — зменшуватися ($3,5 \% \pm 0,54 \%$; $P < 0,001$). Водночас у щурів II групи відмічено зниження кількості гранулоцитів: базофільних до $0,467 \% \pm 0,1 \%$ ($P < 0,05$), еозинофільних — до $0,933 \% \pm 0,23 \%$, нейтрофільних — до $1,4 \% \pm 0,2 \%$ ($P < 0,001$) і макрофагоцитів — до $1,0 \% \pm 0,28 \%$ і різке збільшення кількості плазмоцитів — до $12,933 \% \pm 2,93 \%$ ($P < 0,01$).

Через 3 доби число лімфоцитів у лімфатичних вузлах тварин II групи збільшилось, а всіх інших видів клітин — зменшилось і наблизилось до вихідного значення. У щурів I групи в цей період відмічено максимальну кількість макрофагоцитів — $3,14 \% \pm 0,18 \%$ ($P < 0,001$). Число плазмоцитів ще залишалось високим, а нейтрофільних і базофільних гранулоцитів наблизилось до вихідного значення.

Цитоморфологічними дослідженнями встановлено, що до складу паренхіми селезінки інтактних щурів входять лімфобласти ($0,24 \% \pm 0,12 \%$), лімфоцити ($93,2 \% \pm 1,11 \%$), плазмобласти та плазмоцити ($0,6 \% \pm 0,23 \%$), макрофагоцити ($1,52 \% \pm 0,4 \%$) і гранулоцити: нейтрофільні ($3,92 \% \pm 1,13 \%$) та еозинофільні ($0,52 \% \pm 0,42 \%$). Крім цих клітин у відбитках знаходилися ретикулоцити, фібробластоцити та поодинокі нормоцити. Фібробластоцити — клітини сполучної тканини з котрої побудована сполучнотканинна строма органа, а ретикулоцити входять до складу ретикулярної тканини, яка утворює основу паренхіми селезінки. Нормоцити — клітини 5-го класу еритроцитопоезу.

Після постановки шкірної проби у щурів, сенсibilізованих ФП, співвідношення клітин лімфоїдного ряду, макрофагоцитів і гранулоцитів у паренхімі селезінки змінювалося. Так, через 2 доби частка лімфоцитів зменшилася до $82,38 \% \pm 2,05 \%$ ($P < 0,01$), а потім поступово підвищувалась і наблизилася до вихідного значення ($93,2 \% \pm 1,1 \%$). Число лімфобластів через 1 добу збільшилося у 5,4 раза порівняно з вихідним значенням і становило $1,3 \% \pm 0,24 \%$ ($P < 0,01$), через 2 доби — значно зменшилося до $0,6 \% \pm 0,12 \%$, а через 3 доби — знову збільшилося до $1,04 \% \pm 0,16 \%$ ($P < 0,01$). Вихідного значення цей показник досяг через 10 діб. Протягом 2 діб частка плазмоцитів збільшилася в 7,6 раза ($4,54 \% \pm 1,12 \%$; $P < 0,05$). Через 3 доби їх число зменшилося до $3,36 \% \pm 0,4 \%$, а через 6 діб наблизилася до вихідного значення. Відмічені значні коливання частки макрофагоцитів за період спостереження. Так, через 2 доби їх число збільшилося в

2,8 раза — від $1,52 \pm 0,4$ до $4,18 \% \pm 0,61 \%$ ($P < 0,05$), до 3-ї доби — зменшилася до $3,0 \% \pm 0,4 \%$, а потім — знову збільшилося. Максимальна кількість макрофагоцитів у селезінці сенсibilізованих щурів зафіксована через 6 діб після постановки шкірної проби — $5,35 \% \pm 1,31 \%$.

Серед гранулоцитів відмічені істотні зміни щодо частки їх нейтрофільних форм. Протягом 2 діб їх число збільшилося до $7,8 \% \pm 0,88 \%$ ($P < 0,05$), а потім різко зменшилося до $2,88 \% \pm 0,39 \%$. Частка еозинофільних гранулоцитів майже не змінювалася.

Слід зазначити, що в селезінці інтактних щурів ми не виявили базофільних гранулоцитів. У щурів I групи через 1 добу після внутрішньошкірного введення антигену їх частка становила $0,225 \% \pm 0,12 \%$, потім зменшилася та через 6 і 10 діб у відбитках ми не виявили базофільних гранулоцитів.

Цитоморфологічні дослідження селезінки щурів II групи після постановки шкірної проби свідчать про те, що достовірно значимо змінювалася частка гранулоцитів, особливо через 1 добу. Так, відмічено збільшення кількості еозинофільних гранулоцитів у 4,2 раза (від $0,52 \pm 0,42$ до $2,2 \% \pm 0,115 \%$, $P < 0,05$), нейтрофільних — майже в 1,5 раза (від $3,92 \pm 1,13$ до $5,75 \% \pm 0,43 \%$). Частка базофільних гранулоцитів у цей час становила $0,35 \% \pm 0,13 \%$. Надалі число гранулоцитів зменшувалося.

Істотно збільшувалася (в 4,3 раза) кількість плазмоцитів через 3 доби після введення антигену. Так, у паренхімі селезінки на ці клітини припадало $2,6 \% \pm 0,94 \%$, а через 6 діб частка їх зменшилася до вихідного значення. Число лімфоцитів протягом спостереження майже не змінювалось і коливалося в межах від 0 до $0,36 \% \pm 0,04 \%$. Кількість лімфоцитів дещо зменшилася через 1 добу, а потім була близькою до вихідного значення.

Розвиток гістологічних змін у плесновому м'якуші сенсibilізованих щурів свідчить, що реакція на внутрішньошкірне введення антигену проходить по типу реакцій сповільненої гіперчутливості. В ньому відбуваються зміни схожі з такими, які описані при внутрішньошкірному введенню туберкуліну [5]. У наших дослідженнях через 1 добу після введення антигену в основі м'якуша сенсibilізованих щурів спостерігалася значна інфільтрація гранулоцитами, що відповідає другій хвилі поліморфноядерної інфільтрації. У цей же час зареєстровано максимальну кількість нейтрофільних гранулоцитів у відбитках підколінних лімфатичних вузлів, куди відтікає лімфа з тазових кінцівок. Через 2 і 3 доби клітинний інфільтрат в основі плеснового м'якуша змінився і містив переважно лімфоцити та макрофагоцити. Зміни в лімфатичних вузлах корелювали з такими в плесновому м'якуші — кількість нейтрофільних гранулоцитів зменшувалася, а макрофагоцитів і плазмоцитів — збільшувалася.

У щурів II групи зміни в плесновому м'якуші були не досить виразними. Незначний клітинний інфільтрат дерми складався з гранулоцитів, лімфоцитів і макрофагоцитів. У лімфатичних вузлах через 1 добу значно збільшилася частка нейтрофільних, еозинофільних і базофільних гранулоцитів. Через 2 доби зафіксовано різке збільшення числа плазмоцитів, яке через 3 доби повернулося до вихідного значення. На наш погляд такі зміни в лімфатичних вузлах можуть відбуватися при реакції негайного типу. Відомо, що базофільні гранулоцити (тучні клітини) відіграють важливу роль у

розвитку цих реакцій [7]. Крім різних медіаторів запалення вони виділяють і хемотаксичні фактори для еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитів, кількість яких у вогнищі збільшується.

Порівнюючи зміни клітинного складу селезінки щурів, оброблених ФП (І група) і не оброблених ним (ІІ група) у період розвитку шкірної реакції, можна зробити висновок, що ФП стимулює лімфоцитопоез та утворення факторів гуморального імунітету.

Antonio B. A. Chivinda Eduardo, I. G. Kalinovska

IMMUNOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE LYMPHATIC NODULES AND SPLEEN OF THE TRANSFER FACTOR SENSITIZED RATS

Changes in the rats' metatarsal pad and lymphoid organs were studied during the dermal test performing. It had been found that the dermal reaction to the antigen injection develops in the delayed hypersensitivity type. The histological changes in the examined rats' metatarsal pad correlate with changes in the popliteal lymph nodes' cell population. The lymphoblasts' number increase in the examined rats' spleen evidence the Transfer factor stimulation of the lymphocytopoiesis and plasmocytes number increase evidence the stimulation of the humoral immunity factors.

National Agrarian University, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ивлева Е.А., Лезвинская Е.М.* Цитологический анализ лимфоидных органов при экспериментальной сенсибилизации ДНХБ // Вест. дерматологии. — 1979. — №1. — С. 12-17.
2. *Карпуть И.М.* Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. — Минск: Ураджай, 1986. — 183 с.
3. *Общая морфология и патология иммунитета / Киселева А.Ф., Чернышенко Л.В., Радзиховский А.П., Кейсевич Л.В.* — К.: Наук. думка, 1994. — 203 с.
4. *Біологічна активність фактора переносу, індукованого бактеріальними антигенами / Любченко Т.А., Голева О.Г., Холодна Л.С. та ін.* // Мікробіол. журн. — 1997. — Т. 59, № 5. — С.83-100.
5. *Медуницын Н.В.* Повышенная чувствительность замедленного типа (клеточные и молекулярные основы). — М.: Медицина, 1983. — С.160.
6. *Меркулов Г.А.* Курс патогистологической техники. — Л.: Медицина, 1969. — 424 с.
7. *Польнер А.А.* Иммунологические механизмы аллергических реакций // Биология. — 1983. — №1. — С.55-62.
8. *Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артомасова А.В.* Аллергические заболевания. — М.: Медицина, 1991. — 368 с.
9. *Шивинда Едуардо А.Б.А.* Отримання і тестування фактору переносу проти деяких бактеріальних і вірусних інфекцій: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. — К., 1999. — 17 с.
10. *Arnaudov A., Tziporkov N.* Some properties and protective activity of specific DLE against Salmonella cholerae suis infection // Biotherapy. — 1996. — 9. — P. 105-108.
11. *Fudenberg H.H., Pizza G.* Transfer factor 1993: New frontiers // Progress in Drug Research. — 1994. — 42. — P. 309-400.
12. *Kirkpatrick C., Smith T.* Serial transfer of delayed hypersensitivity with dialyzable transfer factor // Cell. Immunol. — 1976. — 27. — P. 323-327.
13. *Lawrence H.S., Borkowsky W.* Transfer factor: current status and future prospects. — In.: Xth Int. Symp. On Transfer Factor (22–24 June, 1995, Bologna, Italy): Abstract Book. — Bologna, 1995. — P. 3.
14. *Lawrence H.S., Valentine T.F.* Transfer factor in delayed hypersensitivity // Ann. N.Y. Acad.Sci. — 1970. — 169. — P.269.

*Нац. аграрн. ун-т
Каб. міністрів України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 9.06.99*