

Иргашев А.Ш., Касиева Г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

A.Sh. Irgashev, G. Kasieva

RESULTS OF THE HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL RESEARCH OF CATTLE LYMPH NODES

УДК: 636.22/28:611.4

В статье приводятся результаты исследования гистоструктуры и клеточного состава лимфатических узлов крупного рогатого скота на основе гистологических и иммуногистохимических методов с применением поли- и моноклональных антител.

Ключевые слова: лимфатический узел, крупный рогатый скот, гистоструктура, иммуногистохимия, клеточный состав.

The article presents results of the research of histostructure and the cells of the lymph nodes of cattle on the basis of histological and immunohistochemical methods with using of poly-and monoclonal antibodies.

Key words: lymph node, cattle, histostructure, immunohistochemistry, cell composition.

С внедрением научных достижений на стыке иммунологии и морфологии в проведении морфологических исследований стали регулярно применять иммуногистохимические методы, работа которых основана на иммунных реакциях антиген-антитело непосредственно на гистосреззах органов и тканей.

На сегодня благодаря этим методам с применением моно- и поликлональных антител исследуется клеточный состав иммунокомпетентных органов и тканей, в том числе лимфатических узлов.

В научных журналах мирового значения по исследованию клеточного состава и иммуноморфологии лимфатических узлов крупного рогатого скота с применением иммуногистохимических методов исследований имеются ряд научных сообщений.

М. Gutierrez и др. (1999) провели научные исследования по обнаружению CD2+, CD4+, CD8+, и WC1+ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и макрофагов в фиксированной и заключенные в парафине тканях крупного рогатого скота с использованием ряда антигеновосстанавливающих и усиливающих сигнал техники. В этих целях было исследовано иммунореактивность 25 моноклональных антител к различным антигенам лейкоцитов, фиксированные в формал дихромате и 10% формалине с помощью антиген восстанавливающих методов, и биотинтирамида усиливающих систем. Все лейкоциты исследованных популяций (CD2+, CD4+, CD8+, WC1+ Т-лимфоцитов, В-лимфоциты и макрофаги) были специфически обнаружены при соответствующей комбинации моноклональных антител, антигеновосстанавливающего метода и усиливающей системы. Для обнаружения CD2, WC1+ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и макрофагов, все моноклональные антитела показали иммунореактивность в тканях, фиксированные в формал дихромате и 10% формалине. Необходимость проверки

различных антигеновосстанавливающих методов подчеркнула, как метод выбора для каждого отдельного моноклонального антитела. Включение сигнал усиливающих систем, было необходимо, чтобы наблюдать сильный сигнал и сплошное распространение CD4, CD8 и В-клеток. Фиксация тканей в формал дихромате оказалось лучше, чем в формалине для сохранения поверхностных антигенов, но она уступала для обнаружения макрофагального маркера MAC387 или В-клеточных маркеров BAQ155 или IL-a59.

Anti-C03, Anti-C05, Anti-mb-1, Anti-B29 антитела были пригодны для обнаружения CD3 и CD79 поверхностных маркеров Т- и В-лимфоцитов в тканях крупного рогатого скота, фиксированные в формалине и заключенные в парафин, и распределение В- и Т-клеток лимфоидной ткани крупного рогатого скота было такое, как у людей, которые использовали те же антитела (Jones et al., 1993).

С. W. David и др. (2003) исследовали клеточную пролиферацию, апоптоз, В- и Т-лимфоциты в Пейеровых бляшках подвздошной кишки, вилочковой железе и лимфатических узлах недоношенных телят и полноценнорожденных телят при рождении и на 5-й день жизни.

В исследуемых мезентериальных и прескапулярных лимфатических узлах, количество пролиферирующих клеток и В-лимфоцитов в фолликулах и паракортикальной зоне было больше в группе полноценнорожденных телят, чем в группе недоношенных телят. Усиленный темп пролиферации В-лимфоцитов может сопровождаться усиленным апоптозом В-лимфоцитов (Reynolds, 1997). В соответствии количество апоптотических клеток была выше в группе полноценнорожденных телят, чем в группе недоношенных телят. Кроме того, количество В-лимфоцитов было выше в паракортикальной, чем в фолликулах в группе полноценнорожденных телят, чем в группе недоношенных телят, также демонстрируя возрастзависимый эффект. Большое количество Т-лимфоцитов в лимфатических узлах не позволили точно подсчитать указанные клетки.

Collins L. и др. (1997) обнаружили Т- и В-лимфоциты лошадей и крупного рогатого скота фиксированные в формалине и заключенные в парафине тканях.

Для этого фиксированные в формалине и заключенные в парафине срезы лимфатических узлов, селезенки, тимуса и пейеровых бляшек лошадей и крупного рогатого скота были инкубированы с моноклональными антителами к маркерам BLA.36, B29 и mb -1 В-лимфоцитов и маркерам CD3

и CD5 Т-лимфоцитов. Моноклональное антитело BLA.36 реагировало с 80-90% лимфоцитов в зародышевых центрах и мантийной зоне фолликулов в лимфатических узлах, селезенке, и Пейеровых бляшек. Кроме того, 90% лимфоцитов маргинальной зоны селезенки, и определенное количество лимфоцитов мозговых тяжей лимфатических узлов было иммунопозитивно для BLA.36.

Антитела к B29 и mb -1 дали такие же результаты, как и BLA.36, но с меньшим количеством позитивных клеток в зародышевом центре и мозговых тяжях. BLA.36, B29, и mb -1 реагировали с 30- 50 % лимфоцитов мозгового вещества тимуса и с 5-10% лимфоцитов коркового вещества тимуса. CD3 и CD5 реагировали с 90% лимфоцитов паракортикальной и парафолликулярных зон лимфатических узлов, селезенки, и Пейеровых бляшек; 40-50% лимфоцитов мозговых тяжей лимфатических узлов, и имелись разбросанные позитивные клетки в фолликулах.

Анти-CD3 антитело отреагировало с 95% лимфоцитов красной пульпы селезенки, но антител, направленных против CD5 только слабо отреагировал примерно 5-10% лимфоцитов красной пульпы. CD3 и CD5 отреагировали с 50-60% клеток мозгового вещества тимуса и с 40-80% лимфоцитов коркового вещества тимуса. Биохимические характеристики антител с помощью Вестерн-блоттинга против лизатов мононуклеарных клеток периферической крови лошадей и крупного рогатого скота подтвердили, что антитела к BLA.36, mb -1, B29, CD3, и CD5 обнаружили молекулы примерно одинаковую молекулярную массу, которые обнаружены на лимфоидных клетках человека и крыс.

Вышеуказанные результаты проведенных исследований показывают, что иммуногистохимические исследования с использованием поли- и моноклональных антител успешно применяются в морфологических исследованиях, в частности при исследовании клеточного состава и морфофункциональной активности иммунокомпетентных клеток.

Цель настоящей работы заключается в демонстрации в парафиновых гистосреззах структуру и клеточный состав лимфатических узлов крупного рогатого скота с помощью гистологических и иммуногистохимических методов.

Объекты и методы исследования

Работа выполнялась на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы, гистологии и патологии факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина и в лаборатории иммуногистохимии и гематологии института ветеринарной патологии факультета ветеринарной медицины Гиссенского Университета.

После забоя 7 голов крупного рогатого скота в

возрасте от 1,5 до 7 лет в убойных пунктах городов Ош и Бишкек лимфатические узлы забитых животных были подвергнуты детальному осмотру для исключения каких-либо патологий в органах. При наличии каких-либо макроскопических изменений в целом в организме и в частности в лимфатических узлах, они не подвергались дальнейшему морфологическому исследованию.

Кусочки от лимфатических узлов после детального осмотра были зафиксированы в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина. После фиксации дальнейшая гистологическая процедура (обезвоживание и заключение в парафин кусочков) производилась в наших обычных лабораторных условиях (вручную) и в специальной машине в вакууме (автоматически). Из парафиновых блоков готовились серийные срезы на санном микротоме толщиной 4-6 мкм и на микротоме новой модификации толщиной 2-3 мкм. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином для анализа общей гистокартины и клеток лимфатических узлов.

При иммуногистохимическом исследовании гистологических срезов селезенки были использованы ABC (avidin-biotin complex) метод для выявления В-лимфоцитов, PAP (peroxidase-antiperoxidase complex) метод для выявления Т-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток.

Для демонстрации Т-лимфоцитов использовали антисыворотку Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD 3. Code No. A. 0452, (PAP); В-лимфоцитов - антисыворотку Monoclonal Mouse Anti-Human B-Lymphocyte Antigen (BLA. 36), (ABC); макрофагов – антисыворотку Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387. Code Nr. M0747 (PAP); пролиферацию клеток - антисыворотку Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10. Code-Nr. M 0879 (PAP).

При положительной реакции CD 3 положительные клетки (Т- лимфоциты), BLA. 36 положительные клетки (В- лимфоциты), клетки в состоянии пролиферации окрашивались в коричневый цвет, MAC 387 положительные клетки (макрофаги) – в темно-коричневый цвет.

Результаты собственных исследований

При гистологическом исследовании лимфатических узлов мы обратили основное внимание на клетки коркового и мозгового вещества паренхимы органа, которая представлена лимфоидной и ретикулярной тканью. Гистологически паренхима органа состоит преимущественно из лимфоцитов различных размеров (Рис. 1). Из-за рыхлого расположения иммунокомпетентных клеток в синусах и тяжях мозгового вещества органа можно показать клеточный состав лимфатических узлов. В мозговом веществе видны ретикулярные клетки, лимфоциты различных размеров, макрофаги, плазматические клетки, эозинофилы (Рис 2).

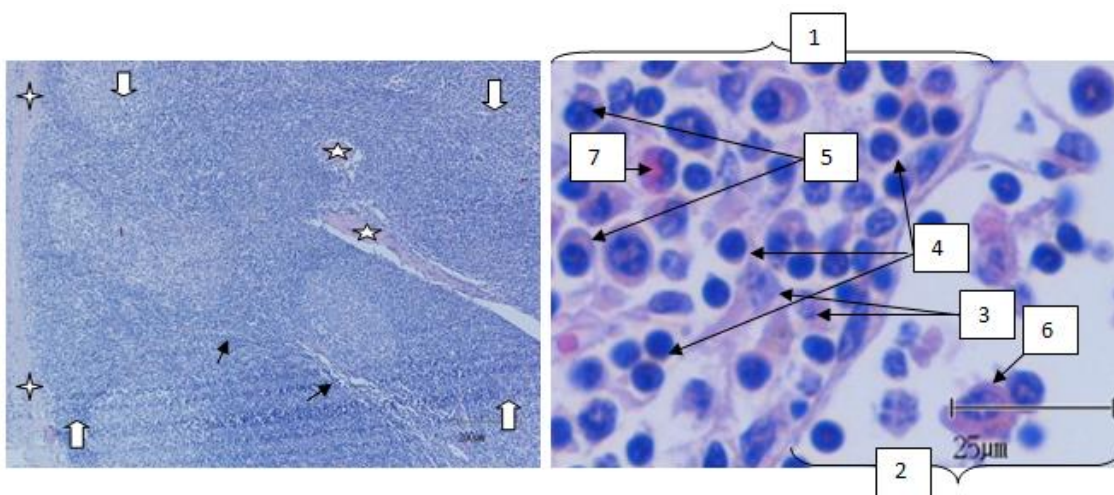


Рис. 1. Парафиновые срезы лимфатического узла крупного рогатого скота.

Нормальная гистоструктура лимфатического узла. Видны капсула (4-конечная звезда), трабекулы (5-конечная звезда), синусы (черные стрелки), паренхима и лимфоидные фолликулы различных размеров (белые стрелки). Паренхима преимущественно состоит из лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, $\text{bar} = 200\mu\text{m}$.

Рис. 2. Парафиновые срезы лимфатического узла крупного рогатого скота.

Видны мозговой тяж (1), мозговой синус (2), ретикулярные клетки (3), лимфоциты (4), плазматические клетки (5), макрофаг (6), эозинофил (7). Окраска гематоксилином и эозином, $\text{bar} = 25\mu\text{m}$;

Иммуногистохимические исследования лимфатических узлов позволили выявить Т- лимфоциты, В-лимфоциты, макрофаги и пролиферации лимфоидных клеток, а также места их расположения.

Т-лимфоциты в большом количестве расположены в Т-зависимой зоне, т.е. паракортикальной и межфолликулярных зонах коркового вещества (Рис.3 а), менее в мозговом веществе и в виде единичных

клеток в фолликулах, особенно в герминативном центре (Рис. 3а).

В-лимфоциты в большом количестве расположены в лимфоидных фолликулах (Рис.3 б). В зависимости от функционального состояния лимфоидных фолликул количество В-лимфоцитов варьирует. В - лимфоциты встречаются в мозговом веществе и в виде единичных клеток в Т-зависимой зоне лимфатического узла (Рис. 3 б).

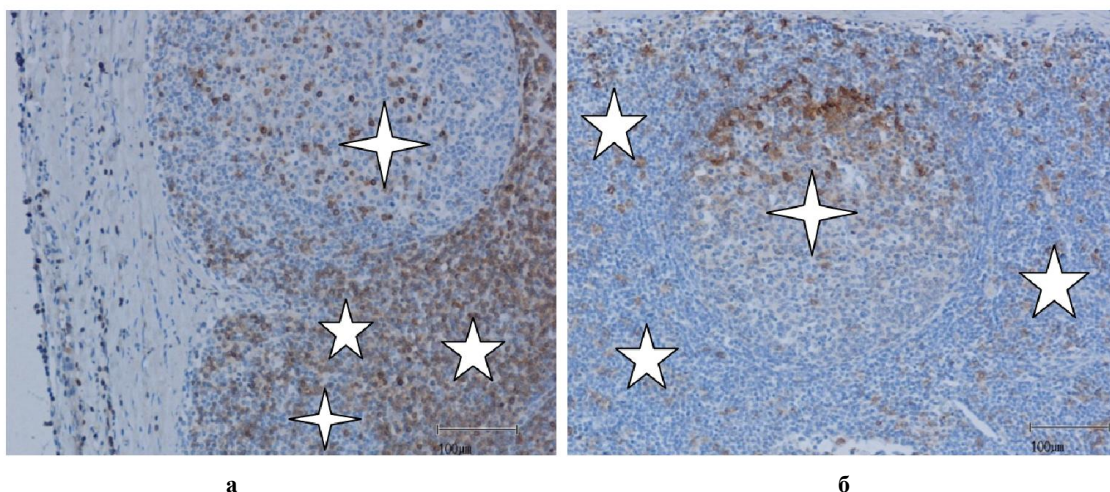


Рис. 3. Парафиновые срезы лимфатического узла крупного рогатого скота.

Т-зависимая зона лимфатического узла (5-конечная звезда);

В-зависимая зона лимфатического узла (4-конечная звезда);

а. Иммуногистохимическое выявление Т- лимфоцитов. Масса Т- лимфоцитов в Т-зависимой зоне и в малом количестве в В-зависимой зоне белой пульпы. РАР метод, $\text{bar} = 100\mu\text{m}$;

б. Иммуногистохимическое выявление В-лимфоцитов. Масса В- лимфоцитов в В-зависимой (фолликулярной) зоне белой пульпы. АВС метод, $\text{bar} = 100\mu\text{m}$;

Макрофаги выявлены как в корковом, так и в мозговом веществе лимфатического узла. В корко-

вом веществе в основном они в виде единичных клеток расположены в фолликулах и межфол-

ликулярных зонах (Рис.4а). В мозговом веществе количество макрофагов больше, чем в корковом веществе. В основном они расположены в мозговых тяжах и синусах (4б).

Проплиферация лимфоидных клеток отмечена как в корковом и мозговом веществе лимфа-

тического узла. В лимфоидных фолликулах или В-зависимых зонах, особенно активных, количество пролиферирующих клеток в несколько раз превышает по сравнению с пролиферацией клеток в корковом и мозговом веществе (Рис.4 б).

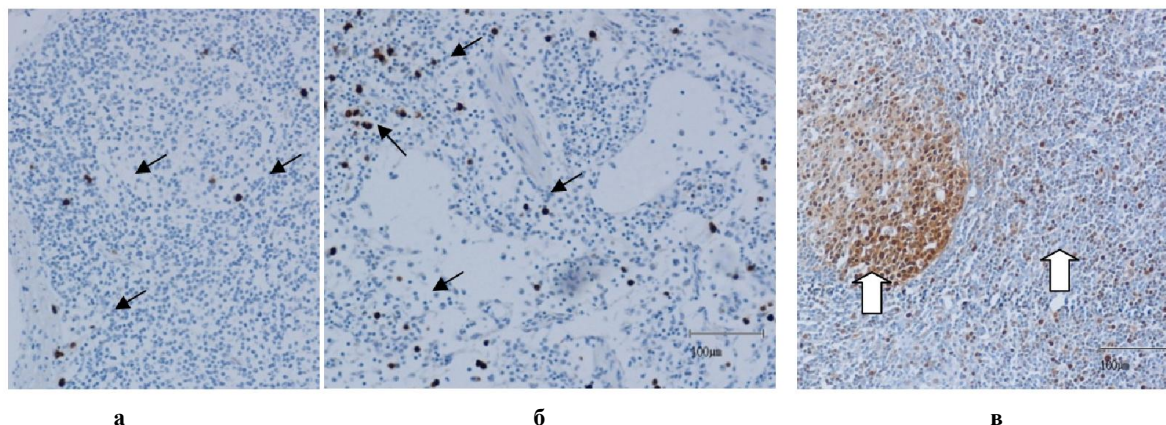


Рис. 4. Парафиновые срезы лимфатического узла крупного рогатого скота.

Иммуногистохимическое выявление макрофагов.

а. Макрофаги в корковом веществе лимфатического узла (черные стрелки). РАР метод, $bar=100\mu m$; б. Макрофаги мозговом веществе лимфатического узла (черные стрелки). РАР метод, $bar=100\mu m$; в. Иммуногистохимическое выявление пролиферации лимфобластов. Проплиферация лимфобластов в В-зависимой и Т-зависимой зонах лимфатического узла. РАР метод, $bar=100\mu m$.

Выводы

1. С помощью гистологических исследований описана структура и клеточный состав лимфатического узла клинически здорового крупного рогатого скота.

2. Благодаря гистологическим и иммуногистохимическим методам исследований определено место локализации Т- и В- лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов и пролиферация лимфоидных клеток.

3. Определена граница Т- и В-зависимой зоны лимфатического узла.

4. Макрофаги встречаются в корковом и мозговом веществе органа, но количество их преобладает в мозговом веществе.

5. Проплиферация лимфоидных клеток преобладает в В-зависимой зоне.

5. В мозговом веществе лимфатического узла Т-лимфоциты, В-лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги располагаются диффузно, но количество Т-лимфоцитов преобладает.

7. Полученные данные по цитологии и иммуноморфологии лимфатического узла можно применить как базовые морфологические данные при морфологическом исследовании патологий лимфатических узлов крупного рогатого скота при

различных болезнях.

Литературы

1. C. W. David, J. Norrman, H. M. Hammon, W. C. Davis, and J. W. Blum. 2003. Cell Proliferation, Apoptosis, and B- and T-Lymphocytes in Peyer's Patches of the Ileum, in Thymus and in Lymph nodes of Preterm Calves, and in Full-Term Calves at Birth and on Day 5 of Life. *J. Dairy Sci.* 86:3321–3329.
2. M. Gutierrez, F.I. Forster, S.A. McConnell, J.P. Cassidy, J.M. Pollock, D.G. Bryson, 1999. The detection of CD2+, CD4+, CD8+, and WC1+ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 321-334.
3. Collins, L., Mahaffey, E.A., Bounous, D.I., Antczak, D.F., Brooks, R.L., 1997. Detection of equine and bovine T-and B-lymphocytes in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57, 187- 200.
4. Jones, M., L. J. Cordell, A. D. Beyers, A. G. D. Tse, and D. Y. Mason. 1993. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J. Immunol.* 150:5429– 5435.
5. Reynolds, J. D. 1997. The genesis, tutelage and exodus of B cells in the ileal Peyer's patch of sheep. *Int. Rev. Immunol.* 15:265–299.

Рецензент: д.вет.н., профессор Тулобаев А.З.