

С.С. Попко

**ДИНАМІКА КЛІТИННОГО СКЛАДУ
ЛІМФОЇДНИХ ВУЗЛИКІВ ЛЕГЕНЬ
ОВАЛЬБУМІН-СЕНСИБІЛІЗОВАНИХ
МОРСЬКИХ СВИНОК**

Запорізький державний медичний університет
пр. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна
Zaporizhzhia State Medical University
Maiakovskiy av., 26, Zaporizhzhia, 69035, Ukraine
e-mail: kluchkosv@gmail.com

Цитування: Медичні перспективи. 2022. Т. 27, № 3. С. 16-21

Cited: Medicni perspektivi. 2022;27(3):16-21

Ключові слова: лімфоїдний вузлик, морська свинка, легень, алергічне запалення, овальбумін
Key words: lymphoid nodule, guinea pig, lung, allergic inflammation, ovalbumin

Реферат. Динаміка клітинного складу лімфоїдних вузликів легень овальбумін-сенсibilізованих морських свинок. Попко С.С. У статті розглянуто морфологічні аспекти динаміки клітинного складу лімфоїдних вузликів легень морських свинок як наслідок експериментального овальбумін-індукованого алергічного процесу. Вивчалася реактивність імунокомпетентних клітин лімфоїдних утворень легень після триразової підшкірної сенсibilізації та подальшої 8-денної інтраназальної аероалергізації овальбуміном у ранньому та пізньому періоді алергічного запального процесу мікроскопічним, морфометричним та статистичним методами. Застосування морфометричного аналізу дозволило виявити загальну закономірність реактивності місцевої специфічної ланки імунної системи легень на дію алергену, яка полягає в збільшенні середньої кількості імунокомпетентних клітин лімфоїдних вузликів легень, починаючи з 30-ї до 44-ї доби після початку експерименту. Серед усіх видів імунокомпетентних клітин лімфоїдних вузликів легень під час експерименту максимальний коефіцієнт збільшення в 5,8 раза спостерігався при підрахунку плазмоцитів. Статистично доведено, що реалізація овальбумін-індукованого алергічного запального процесу в легенях відбувається за гуморальним типом і тривалість його перебігу не обмежується безпосереднім впливом алергену, але й продовжується після закінчення його дії, що є проявом змін компенсаторно-приспосувальних процесів локальної імунної системи легень протягом овальбумін-індукованого алергічного запального процесу.

Abstract. Dynamics of the cellular composition of lymphoid nodules in the lungs of guinea pigs sensitized with ovalbumin. Popko S.S. The article discusses the morphological aspects of the dynamics of the cellular composition of lymphoid nodules in the lungs of guinea pigs as a result of an experimental ovalbumin-induced allergic process. We studied the reactivity of immunocompetent cells of lymphoid formations of the lungs after three times subcutaneous sensitization and subsequent 8-day intranasal aeroallergization with ovalbumin in the early and late stage period of the allergic inflammatory process by microscopic, morphometric and statistical methods. By help of morphometric analysis we demonstrate the general regularity of reactivity of a local specific link of the pulmonary immune system to the action of an allergen, which consists in the elevation of the average amount of immune cells of lymphoid nodules of the lungs, starting from the 30th to the 44th day after the start of the experiment. The maximal coefficient of increase by 5.8 times was observed in counting plasma cells among all types of immunocompetent cells of lymphoid nodules in the lungs during the experiment. It has been statistically proven that the implementation of the ovalbumin-induced allergic inflammatory process in the lungs proceeds according to the humoral type and the duration of its course is not limited by the direct influence of the allergen, it also continues after the end of its action, which is a manifestation of changes in compensatory-adaptive processes in the pulmonary immune system with ovalbumin-induced allergic inflammation.

Дотепер і на сьогодні увагу науковців привертають проблеми реактивності локальної імунної системи органів дихання під впливом несприятливих факторів зовнішнього середовища, у тому числі алергенного характеру [2, 3, 4]. Вченими-морфологами накопичено великий обсяг наукових даних, присвячених дослідженню структури та функцій лімфоїдної тканини,

асоційованої з бронхами, та периваскулярних лімфоїдних вузликів легень у нормі та після антигенного впливу в експерименті [7, 8]. Незважаючи на це, натеper існують суперечливі дані про роль лімфоїдних скупчень легень у розвитку алергічного запалення дихальних шляхів. Одні автори стверджують, що очевидного зв'язку між лімфоїдними вузликами легень та

розвитком алергічного запалення не існує, що підтверджують даними досліджень [2]. Інші дослідження припускають, що хоч присутність лімфоїдних вузликів у легенях і не корелює з алергічним процесом, їх реактивність підвищується в пацієнтів з бронхіальною астмою [4]. Ураховуючи те, що морфологічні зміни локальної імунної системи легень у відповідь на сенсibilізацію аероалергенами вивчені недостатньо, дослідження реактивних змін клітинного складу лімфоїдних вузликів легень є актуальною проблемою експериментальної морфології.

Дослідження є частиною науково-дослідної роботи кафедри гістології, цитології, ембріології Запорізького державного медичного університету за темою «Імуноморфологічні особливості внутрішніх органів при дії ендо- та екзогенних чинників на організм» (№ держреєстрації 0118U004250).

Мета дослідження – визначення реактивних змін у динаміці клітинного складу лімфоїдних вузликів легень овальбумін-сенсibilізованих морських свинок за даними морфометричного дослідження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальні дослідження проведені на 48 статевозрілих самцях морської свинки масою 450-600 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію Запорізького державного медичного університету, схвалені комісією з питань біомедичної етики ЗДМУ. Тварини утримувались і всі маніпуляції на них виконувались згідно з «Правилами використання лабораторних експериментальних тварин» (2006, додаток 4) і Гельсінською декларацією про гуманне ставлення до тварин.

Моделювання алергічного запального процесу проводилось підшкірною сенсibilізацією та наступними щоденними інгаляціями овальбуміном (ОВА) [6]. Протягом 1, 7 та 14-го дня експерименту тварин сенсibilізували підшкірним введенням 0,5 мг овальбуміну (виробник Sigma Chemical Co., США) з ад'ювантом - гідроокисом алюмінію, 10 мг (виробник AlumVax Hydroxide vaccine adjuvant, OZ Biosciences Франція), розведених у фізіологічному розчині. Протягом четвертого тижня експерименту (з 21-го по 28-й день) морським свинкам проводили інгаляцію овальбуміном у дозі 10 мг/мл фізрозчину протягом 15 хв/добу інгалятором LD-211C (виробник Little Doctor International, Сингапур) у герметичній камері. Піддослідні тварини були розподілені на 6 груп (8 тварин у кожній групі). З 1-ї по 4-ту групу – це тварини, виведені з експерименту на 23, 30, 36 та 44-ту добу після його

початку; 5 – контрольна група, тваринам якої вводили фізрозчин; 6 – інтактна група. З метою раціональної подачі одержаних даних та їх інтерпретації ми виділяємо ранню (23-я і 30-та доби експерименту) і пізню (36-та та 44-та доби експерименту) стадії розвитку алергічного запалення.

Евтаназія тварин проводилась передозуванням тіопенталу натрію на 23, 30, 36 і 44-ту добу після початку експерименту. Гістологічні зрізи забарвлювали гематоксилином й еозином. Зрізи легень досліджувалися у світловому мікроскопі Zeiss Primo Star із системою фотодокументування [1, 9]. Рахували середню кількість малих лімфоцитів, макрофагів та дендритних клітин, плазмоцитів у складі перибронхіальних та периваскулярних лімфоїдних вузликів легень у полі зору площею 15000 мкм² при імерсійному зображенні (об. 100).

Статистична обробка результатів виконувалась з використанням стандартного пакета програм Microsoft Office 2010 (Microsoft Excel) і «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США, ліцензія 46 № AXXR712D833214FAN5), за допомогою бібліотек SciPy (BSD License), NumPy (BSD License), pandas-profiling (MIT License), pandas (BSD License). Графічний аналіз статистичних даних здійснювали в matplotlib (BSD License) [5, 10]. Гіпотезу для контролю нормальності розподілу досліджуваних показників перевіряли з використанням критерію узгодженості Колмогорова-Смирнова. Гіпотезу про належність двох незалежних вибірок одному закону розподілу перевіряли за критерієм однорідності Колмогорова-Смирнова. Підраховували середню арифметичну (M) і стандартну похибку середньої ($\pm m$). Статистичну значущість міжгрупової відмінності отриманих даних встановлювали за непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні та параметричним Стьюдента. Статистично значущі відмінності між порівнюваними величинами на рівні 95% ($p < 0,05$). Отримані показники порівнювались між медіаною і міжквартильним розмахом Me (Q1; Q3) [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Лімфоїдна тканина в легенях морської свинки представлена дифузною лімфоїдною тканиною в легеневому інтерстиції та лімфоїдними вузликами в адвентиційній оболонці внутрішньолегеневих бронхів і кровоносних судин, а також субплеврально. Лімфоїдні вузлики мають овальну або круглу форму і розміри, які варіюють від 100 до 350 мкм. Деякі лімфоїдні утворення мають чітко визначену сполучнотканинну капсулу (рис. 1). Між лімфоїдними клітинами в складі вузликів зустрічаються кровоносні судини й фіброласти. Серед імунокомпетентних клітин у

складі лімфоїдних вузликів визначались малі та середні лімфоцити, плазмоцити, макрофаги та дендритні клітини.

При морфометричному дослідженні легень морської свинки інтактної групи середня кількість імунокомпетентних клітин у складі лімфоїдних вузликів була такою: малі лімфоцити $12,62 \pm 0,36$, макрофаги та дендритні клітини $16,25 \pm 0,2$, плазмоцити $4,38 \pm 0,14$ у полі зору. У контрольній групі при аналізі вмісту імунокомпетентних клітин у складі лімфоїдних вузликів у легенях морської свинки виявлено, що була від-

сутня статистично значуща різниця між показниками в інтактній і контрольній групах. На тлі сенсibiliзації та інгаляцій овальбуміном вміст імунокомпетентних клітин у складі лімфоїдних вузликів дещо змінюється. При аналізі кількості малих лімфоцитів на ранніх стадіях розвитку алергічного запалення в легенях виявлено, що їх вміст статистично значущо ($p < 0,05$) збільшувався порівняно з контролем з 30-ї доби після початку експерименту й становив $29,75 \pm 0,53$ у полі зору, що більше показника контрольної групи в 3 рази (рис. 2).

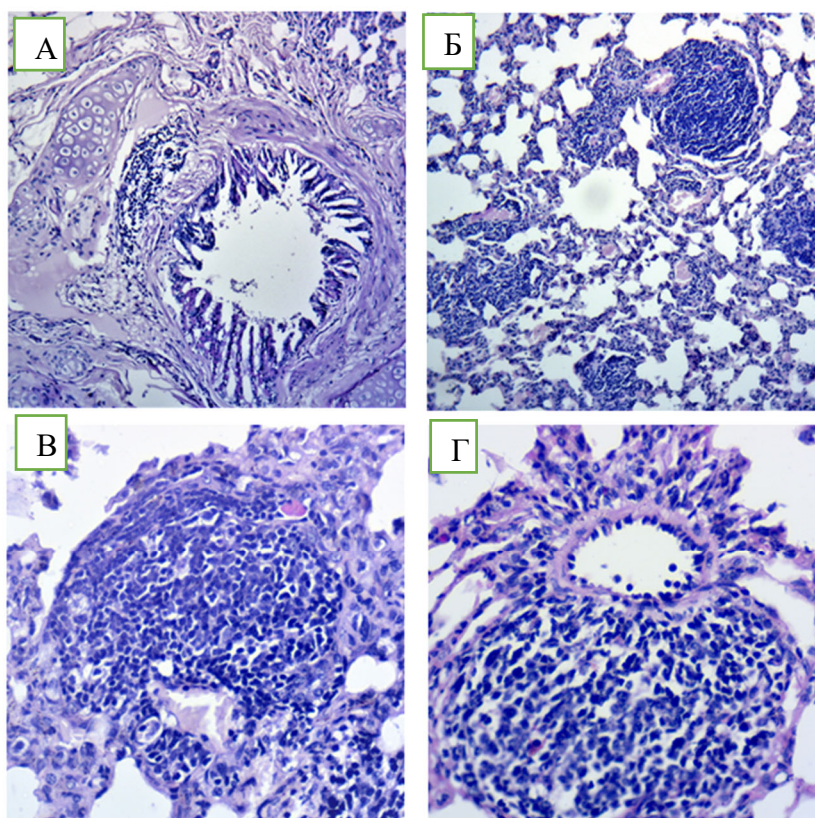
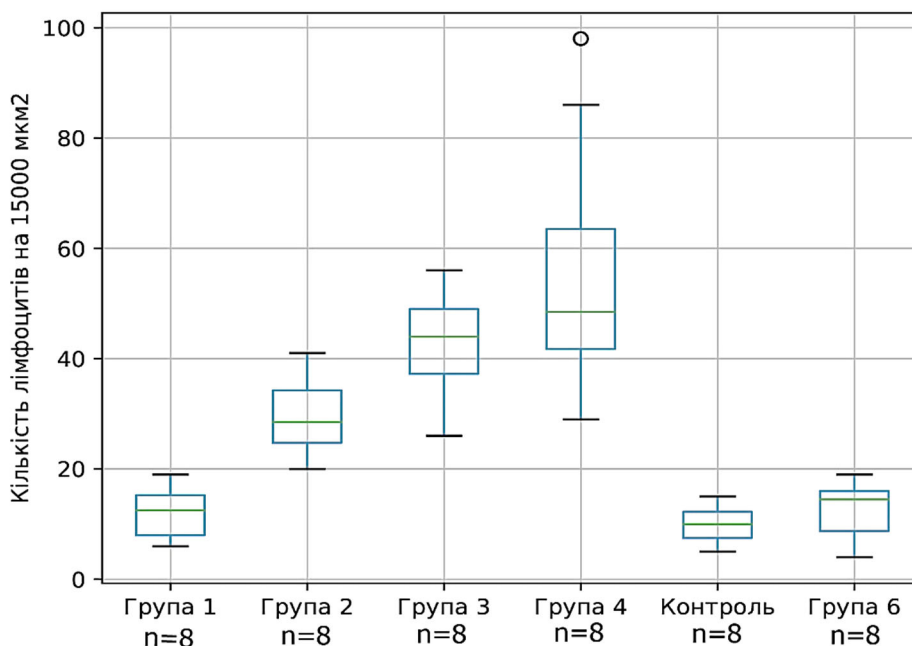


Рис. 1. Лімфоїдні вузлики в легенях морської свинки
Фарбування гематоксилін-еозин. А – контрольна група. Лімфоїдний вузлик у стінці бронха середнього калібра. Б – 2-га експериментальна група. Периваскулярні лімфоїдні вузлики. $\times 100$. В - 3-я експериментальна група. Периваскулярний лімфоїдний вузлик. Г – 4-та експериментальна група. Лімфоїдний вузлик у стінці бронха малого калібра. $\times 400$.

Також статистично значущі відмінності показників кількості малих лімфоцитів у тварин контрольної групи та після сенсibiliзації овальбуміном спостерігалася на пізніх стадіях розвитку алергічного запалення в легенях (36-та й 44-та доби після початку експерименту) у тварин 3-ї та 4-ї експериментальних груп. Максимальних значень середня кількість малих лімфоцитів досягала на 44-ту добу спостереження – $55,38 \pm 1,75$ у полі

зору. Максимальний коефіцієнт збільшення спостерігався в 4-й експериментальній групі і порівняно з контролем становив 5,6 (рис. 2). Необхідно врахувати той факт, що остання інгаляція відбулася на 28-му добу після початку експерименту, відповідно збільшення вмісту малих лімфоцитів на 44-ту добу може свідчити про продовження реакції локальної специфічної ланки імунної системи легень вже при відсутності дії алергену.

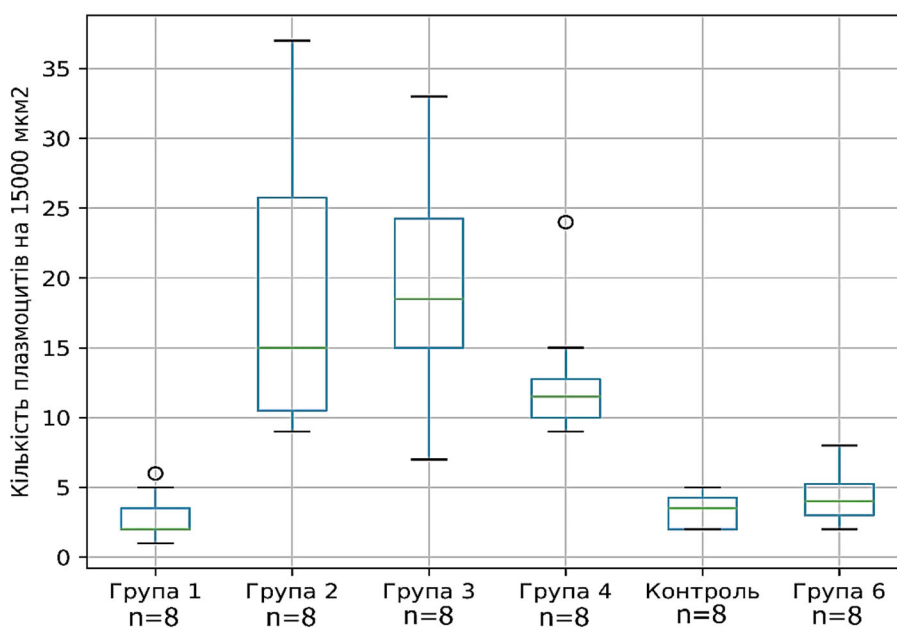


$p < 0.05$. Me (Q1; Q3).

Рис. 2. Динаміка змін середньої кількості малих лімфоцитів у лімфоїдних вузликах легень морської свинки

Середня кількість плазмоцитів у лімфоїдних вузликах легень після дії овальбуміну статистично значущо ($p < 0,05$) збільшилася з 30-ї доби після початку експерименту й становила $18,62 \pm 0,74$ у полі зору, порівняно з інтактними й контрольними тваринами (коефіцієнт збільшення 5,5). Максимальний приріст кількості

плазмоцитів у лімфоїдних вузликах легень після дії овальбуміну в експериментальних групах ми спостерігали на 36-ту добу після початку експерименту, він становив $19,75 \pm 0,63$ у полі зору (коефіцієнт збільшення 5,8) та дещо зменшувалася на 44-ту добу спостереження і становив $12,88 \pm 0,35$ у полі зору (рис. 3).

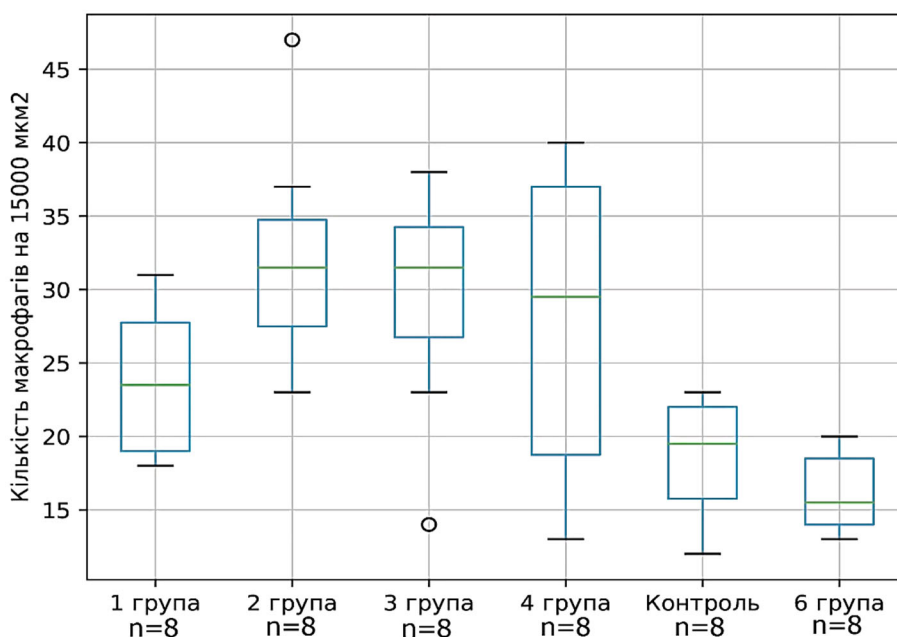


$p < 0.05$. Me (Q1; Q3)

Рис. 3. Динаміка змін середньої кількості плазмоцитів у лімфоїдних вузликах легень морської свинки

При аналізі кількості макрофагів та дендритних клітин у ранньому періоді експерименту виявлено, що їх вміст статистично значущо збільшувався ($p < 0,05$) з 23-ї доби після початку експерименту ($23,88 \pm 0,39$ у полі зору) порівняно з аналогічними даними в інтактній та контрольній групах (рис. 4). Максимальний коефіцієнт збільшення середньої кількості макрофагів та дендритних клітин порівняно з контролем спостерігався на 30-ту добу дослідження в 2-й експериментальній групі і становив 1,8. Також

статистично значуща різниця вмісту макрофагів та дендритних клітин порівняно з аналогічними показниками в контрольній та інтактній групах спостерігалася в пізньому періоді розвитку алергічного запалення (36-та і 44-та доби після початку експерименту) у тварин 3-ї та 4-ї експериментальних груп. Максимальних значень вміст макрофагів та дендритних клітин досягав на 30-ту добу спостереження ($32,25 \pm 0,53$ у полі зору), після чого поступово зменшувався, але не сягав показників контролю на 44-ту добу спостереження (рис. 4).



$p < 0.05$. Me (Q1; Q3).

Рис. 4. Динаміка змін середньої кількості макрофагів і дендритних клітин у лімфоїдних вузликах легень морської свинки

Отже, середня кількість малих лімфоцитів зростала, починаючи з 30-ї доби експерименту, і була максимальною на 44-ту добу спостереження. Коефіцієнт зростання кількості малих лімфоцитів становив 5,6. Максимального збільшення кількості плазмоцитів набувала на 36-ту добу експерименту (коефіцієнт збільшення 5,8). Зростання кількості макрофагів продемонстровано на 30-ту добу експерименту (коефіцієнт збільшення 1,8). В експерименті максимального збільшення кількості в 5,8 раза зазнавали плазмоцити. Такі кількісні зміни показників свідчать про те, що реалізація овальбумін-індукованого алергічного запального процесу в легенях відбувається за гуморальним типом і тривалість його перебігу не обмежується безпосереднім впливом антигена, але й продовжується після закінчення його дії. Продемонстровані зміни в лімфоїдних вузликах

легень при алергічному запальному процесі підтверджуються даними інших наукових досліджень [3, 7].

Сенсибілізація та інгаляції овальбуміном ініціюють алергічний запальний процес у дихальних шляхах морських свинок. Патологія запалення включає низку процесів із залученням різноманітних клітин, медіаторів і цитокінів, взаємодія між якими формує специфічний тип запалення і внаслідок нього ремоделювання бронхіального дерева [4]. Найсуттєвішими доказами маніфестації алергічного запалення в дихальних шляхах морської свинки, окрім еозинофільної інфільтрації як результату реакції вродженого імунітету на вплив алергену, є зростання кількості лімфоїдних вузликів та зміни в їхньому клітинному складі [6, 7]. Реакція вродженого імунітету ініціює низку реакцій гуморальної ланки

адаптивного імунітету, внаслідок чого плазмацитами синтезуються антитіла ОВА-IgE.

ВИСНОВКИ

1. У ході дослідження виявлена загальна закономірність реактивності місцевої специфічної ланки імунної системи легень на дію алергену, що полягає в збільшенні середньої кількості імунокомпетентних клітин лімфоїдних вузликів легень на 30-44-ту доби спостереження ($p < 0.05$).

2. На пізніх стадіях розвитку індукованого овальбуміном алергічного запалення (36-та та 44-та доба експерименту) переважають прояви специфічної резистентності дихальних шляхів, а саме активація локальної ланки гуморального й

клітинного набутого імунітету, підтверджена динамікою кількості лімфоцитів (коефіцієнт зростання 5,6 у 4-й експериментальній групі) і плазмочитів (коефіцієнт зростання 5,8 у 3-й експериментальній групі) в лімфоїдних вузликах легень морської свинки.

3. Виявлений характер запального процесу, який триває у внутрішньолегевених дихальних шляхах і після закінчення впливу алергену, є проявом змін компенсаторно-приспосувальних процесів місцевої імунної системи легень протягом алергічного запального процесу.

Фінансування. Дослідження не має зовнішніх джерел фінансування.

Конфлікт інтересів. Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

REFERENCES

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Singapore: Springer; 2018.
doi: <https://www.springer.com/gp/book/9789811082511>
2. Hwang JY, Randall TD, Silva-Sanchez A. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Frontiers in Immunology*. 2016 Jun 30;7(258).
doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00258>
3. Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Take-no N, Mochizuki M, et al. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nature Immunology*. 2015 Nov 23;17(1):76-86.
doi: <https://doi.org/10.1038/ni.3309>
4. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nature Immunology*. 2014 Dec 18;16(1):45-56.
doi: <https://doi.org/10.1038/ni.3049>
5. Petrie A, Sabin C. *Medical Statistics at a Glance*. 4th ed. Wiley-Blackwell; 2019.
6. Popko SS, Evtushenko VM, Syrtsov VK. Influence of pulmonary neuroendocrine cells on lung homeostasis. *Zaporozhye medical journal*. 2020;22(4):568-75.
doi: <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2020.4.208411>
7. Baluk P, Adams A, Phillips K, Feng J, Hong Y-K, Brown MB, et al. Preferential Lymphatic Growth in Bronchus-Associated Lymphoid Tissue in Sustained Lung Inflammation. *The American Journal of Pathology*. 2014 May;184(5):1577-92.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.021>
8. Klose CSN, Mhlaköiv T, Moeller JB, Rankin LC, Flamar A-L, Kabata H, et al. The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation. *Nature*. 2017;549(7671):282-6.
doi: <https://doi.org/10.1038/nature23676>
9. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets' OH, Hryshchuk MI, Bahriy MM. [Methods of morphological research: monograph]. Vinnytsia: Nova knyha; 2016. Ukrainian.
10. Plas DzhV. [Python for complex tasks. Data Science and Machine Learning]. SPb.: Pyter; 2018. Russian.

Стаття надійшла до редакції
02.12.2020

