

С.С.Ключко

Запорожский государственный медицинский университет.

**Ключевые слова:** желудок, иммуногистохимия, CD3 антиген, CD79 $\alpha$  антиген.

Надійшла: 20.02.2014

Прийнята: 12.03.2014

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2014.1.46-52>

УДК 611.33.08: 612.017

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В СТРУКТУРАХ ЖЕЛУДКА КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИУТРОБНОГО ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНА

*Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Морфофункциональные особенности слизистых оболочек и внутренних органов человека и животных в норме и после введения антигена» (номер государственной регистрации 0103U00939).*

**Реферат.** Цель: изучить динамику количественного и качественного распределения лимфоцитов в желудке крыс после внутриутробного введения антигена при помощи иммуногистохимических, морфометрических и статистических методов. После внутриутробного введения антигена в желудке крыс содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов превышает содержание CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-лимфоцитов. На фоне введения антигена динамика содержания CD3<sup>+</sup> и CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-лимфоцитов меняется. После внутриутробного введения антигена увеличивается содержание CD3<sup>+</sup> и CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-лимфоцитов. Более выраженным является иммунный ответ со стороны В-клеточного звена иммунитета.

**Morphologia.** – 2014. – Т. 8, № 1. – С. 46-52.

© С.С.Ключко, 2014

✉ kluchko\_sv@mail.ru

**Klyuchko S.S. The immunohistochemical analysis of the distribution of different lymphocyte populations in the structures of the rat stomach after intrauterine administration of the antigen.**

**ABSTRACT. Background.** The influence of the antigen on a fetus becomes very actual topic in last 10 years. This fact is closely associated with the stimulation of immune reactions in fetus and neonatal. It is known that the delivery of antigens into the body of the fetus causes premature T-lymphocytes exit from the thymus and their migration to various organs. As a result in these organs the terms and temps of main structural components development vary. **Objective.** To study the dynamics of the distribution of different lymphocyte populations in the stomach wall in the postnatal period after an intrauterine administration of the antigen **Methods.** Rat's stomach at normal condition and after the intrauterine administration of the antigen on the 21<sup>st</sup>, 45<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days of life were investigated. Immunohistochemistry, morphometric and statistical methods were used. **Results.** After the intrauterine antigen administration the content of CD3<sup>+</sup>-lymphocytes in the stomach was significantly higher, than the content of CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-lymphocytes. The greatest number of CD3<sup>+</sup> and CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-lymphocytes is observed over and under the muscularis mucosae of the stomach. In the perivascular spaces the accumulations of lymphocytes are formed; in later age periods they give rise to the perivascular lymphoid nodules. The dynamics of CD3<sup>+</sup> and CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-lymphocytes content changes during the intrauterine antigen administration. **Conclusion.** In response to the intrauterine administration of the antigen there is an increase in the number of CD3<sup>+</sup> and CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-lymphocytes. The immune response of B-cell chain is more intensive and expressed.

**Key words:** stomach, immunohistochemistry, CD3 antigen, CD79 $\alpha$  antigen.

### Citation:

Klyuchko SS. [The immunohistochemical analysis of the distribution of different lymphocyte populations in the structures of the rat stomach after intrauterine administration of the antigen]. *Morphologia*. 2014;8(1):46-52. Russian.

### Введение

Изучение действия антигенов, поступающих в организм плода и вызывающих стимуляцию иммунных реакций, в последние десятилетия приобретает высокую актуальность [1]. Это непосредственно связано с усилением антигенного влияния как на плод, так и на новорожденных вследствие вакцинации. Известно, что поступле-

ние антигенов в организм плода вызывает преждевременный выход Т-лимфоцитов из тимуса и миграцию их в различные органы [2; 3]. В этих органах меняются темпы и сроки развития основных структурных компонентов. Несмотря на то, что в последнее время очень много внимания уделяется изучению различных органов с использованием иммуногистохимического метода,

распределение рецепторов к CD-маркерам в структурах желудка в новорожденных в норме и после внутриутробного введения антигена практически не изучено [4; 5]. В слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта встречаются с большой частотой В-лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности Ig A. Ассоциируя с другими молекулами на поверхности В-клеток, иммуноглобулин образует антигенраспознающий рецепторный комплекс В-лимфоцита. К этим вспомогательным молекулам относятся соединенные дисульфидными связями гетеродимеры, состоящие из Ig  $\alpha$  (CD 79 $\alpha$ ) и Ig  $\beta$  (CD79 $\beta$ ). Эти молекулы, взаимодействуя с иммуноглобулином, участвуют в процессе активации В-лимфоцитов. CD3 представляет собой мембранно-связанный белковый компонент зрелых периферических Т-лимфоцитов из шести полипептидов. При связывании комплекса антиген-молекула главного комплекса гистосовместимости (МНС) и активации зрелых Т-лимфоцитов рецептор CD3 участвует в передаче сигнала внутрь клетки [6]. Поэтому представляется интересным изучение динамики различных популяций лимфоцитов в стенке желудка крыс, как одного из органов, наиболее подвергающихся антигенному влиянию у плода и новорожденных.

#### **Цель**

Изучить динамику распределения различных популяций лимфоцитов в стенке желудка в постнатальном периоде после внутриутробного введения антигена.

#### **Материалы и методы**

В качестве объектов исследования взяты желудки 32 крыс линии Вистар в возрасте 21-х, 45-х и 90-х суток постнатального развития. В эксперименте использовали 2 группы животных: первая – интактные крысы, вторая – экспериментальные животные (по 6 животных каждой возрастной группы), которым вводили антиген внутриплодно на 18 сутки внутриутробного развития. В качестве антигена была выбрана сплит-вакцина для профилактики гриппа инактивированная Ваксигрипп (Санофи Пастер С.А. Франция), которая является зарегистрированным фармакологическим препаратом (сертификат о государственной регистрации медицинского иммунологического препарата № 6367-300200000 от 7 июля 2011). Введение антигена плодам осуществлялось оперативно во время лапаротомии путем чрезматочной инъекции в объеме 0,05 мл в межлопаточную область каждому плоду. Для морфологического исследования материал брали из фундального отдела желудка, фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина на протяжении 10-12 часов.

После фиксации и проводки материал заливался в парафин согласно принятым стандартам. Парафиновые срезы толщиной 4-6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной

методике и подвергали тщательному микроскопическому исследованию. Световая микроскопия проводилась с помощью светового микроскопа Leica DMLS с использованием объективов  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ .

Иммуногистохимический метод позволяет выявлять разнообразные структурные элементы, рецепторы и продукты синтеза клеток и межклеточного пространства. В нашем исследовании срезы толщиной 4-6 мкм наносили на специально обработанные адгезивные предметные стекла SuperFrost Plus, депарафинизировали согласно стандартам. Следующим этапом иммуногистохимического исследования было проведение тепловой индукции эпитопного (антигенного) оборота (HIER - heat induction of epitope retrieval), в результате которого восстанавливались антигенные свойства ткани. Мы использовали высокотемпературную обработку в цитратном буфере с рН=6,0 в микроволновой печи при температуре +100 $^{\circ}$ C (3 раза по 5 минут с периодом охлаждения 15 минут между этапами варения) с симметрическим расположением стекол в кювете. В нашем исследовании в качестве первичных антител мы использовали CD3 (моноклон SP7, фирма Thermo Scientific), CD79 $\alpha$  Ab-1 (моноклон JCB117, фирма Thermo Scientific) с контрольными исследованиями с целью исключения ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Следующий этап иммуногистохимического исследования проводили с использованием системы визуализации последнего поколения Quanto (Thermo Scientific). Вторичные антитела с большим содержанием молекул пероксидазы хрена наносили на срезы и инкубировали во влажных камерах на протяжении 10 минут с промыванием в ТРИС-буферном растворе между каждым этапом на протяжении 5 минут. Идентификация реакции проводилась благодаря нанесению хромогена DAB (Thermo Scientific) под контролем микроскопа на протяжении от 20 секунд до 1 минуты, с проявлением в виде темно-коричневой окраски специфических структур. Для дифференцирования структур ткани срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера на протяжении 1-3 минут. Последующая дегидратация и заключение в бальзам осуществлялось согласно стандартам. Количественные и качественные показатели экспрессии маркеров изучали как минимум на 8-10 случайно выбранных полях зрения гистологических срезов при увеличении  $\times 100$ . Количественный анализ результатов морфометрического исследования и статистическую обработку морфометрических данных проводили с помощью программы Excel. Сравнение средних величин проводили с помощью критерия Стьюдента-Фишера. Отличия двух средних величин считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

На 21-е сутки постнатального онтогенеза в интактной группе среднее количество внутриэпителиальных Т-лимфоцитов составляет  $1,30 \pm 0,05$  в поле зрения, В-лимфоцитов –

$0,30 \pm 0,01$  в поле зрения. После внутриутробного введения антигена количество внутриэпителиальных Т-лимфоцитов увеличивается в 2,8 раза, В-лимфоцитов – в 4,0 раза (рис. 1).

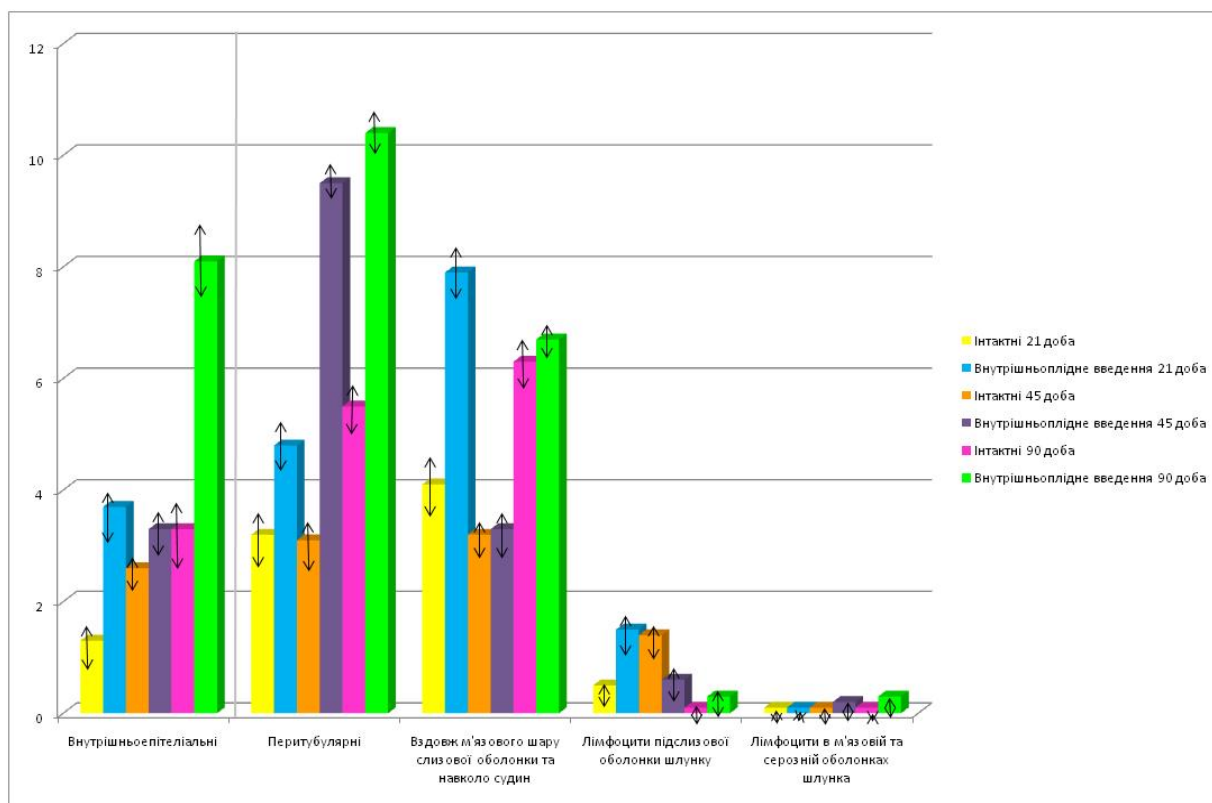


Рис. 1. Изменения содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов в различных структурах дна желудка крыс в динамике эксперимента ( $x \pm S_x$ ).

На 45-е сутки после рождения в интактной группе среднее количество Т-лимфоцитов увеличивается в 2,0 раза по сравнению с предыдущим сроком жизни и составляет  $2,60 \pm 0,12$  в поле зрения, В-лимфоцитов – в 1,3 раза и составляет  $0,40 \pm 0,01$  в поле зрения. После введения антигена внутриплодно количество внутриэпителиальных Т-лимфоцитов увеличивается в 1,2 раза, среднее количество В-лимфоцитов практически не меняется по сравнению с интактными животными. Похожая тенденция сохраняется в отношении внутриэпителиальных В-лимфоцитов, количество которых после антигенной стимуляции возрастает в 3,3 раза. В целом, в период с 21-х по 90-е сутки постнатального периода онтогенеза среди внутриэпителиальных лимфоцитов преобладают CD3<sup>+</sup>-лимфоциты как в интактной группе, так и после внутриплодного введения антигена. После антигенной стимуляции наблюдается тенденция к увеличению количества CD3<sup>+</sup>- и CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-лимфоцитов почти во всех исследуемых группах животных (рис. 2). Интересным фактом является обнаружение в экспериментальной группе в просвете желудка, около

слизистой оболочки, дрожжеподобного грибка типа *Candida albicans*. Как известно, данный микроорганизм появляется в организме при различных иммунодефицитных состояниях (рис. 2).

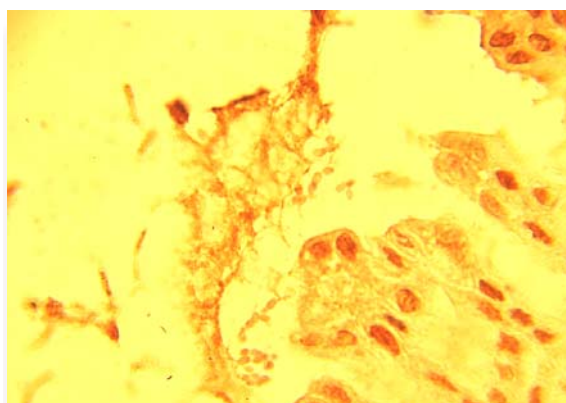


Рис. 2. CD3<sup>+</sup>-лимфоциты внутриэпителиальные. 45 сутки жизни, экспериментальная группа.  $\times 100$ .

Хотя в количественном соотношении преобладают CD3<sup>+</sup>-лимфоциты, но вводимый антиген способствует развитию более интенсивного иммунного ответа со стороны гуморального звена иммунной системы, что подтверждается литературными данными, согласно которым в ответ на введение противогриппозной вакцины возрастает титр защитных антител в крови [7].

В отношении лимфоцитов, находящихся в собственной пластинке слизистой оболочки желудка, непосредственно около собственных желез желудка и между ними (т. н. **перитубулярные** лимфоциты), наблюдаются следующие изменения. В интактной группе на 21-е сутки жизни количество CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов больше в 1,6 раза, чем внутриэпителиальных, количество CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов практически не меняется. После внутриплодного введения антигена количество

перитубулярных CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов возрастает в 1,5 раза, по сравнению с интактными животными, количество CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов по-прежнему не меняется. По сравнению с предыдущим возрастом, на 45-е сутки жизни в интактной группе количество перитубулярных CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов не увеличивается, но больше внутриэпителиальных лимфоцитов в 1,1 раза. На фоне внутриутробного введения антигена сохраняется тенденция к увеличению содержания лимфоцитов как первого, так и второго типа. Содержание перитубулярных CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов в интактной группе в возрасте 45-х суток жизни незначительно увеличивается по сравнению с интактными животными 21-х суток жизни, вследствие введения антигена увеличивается в 2,7 раза (рис.3).

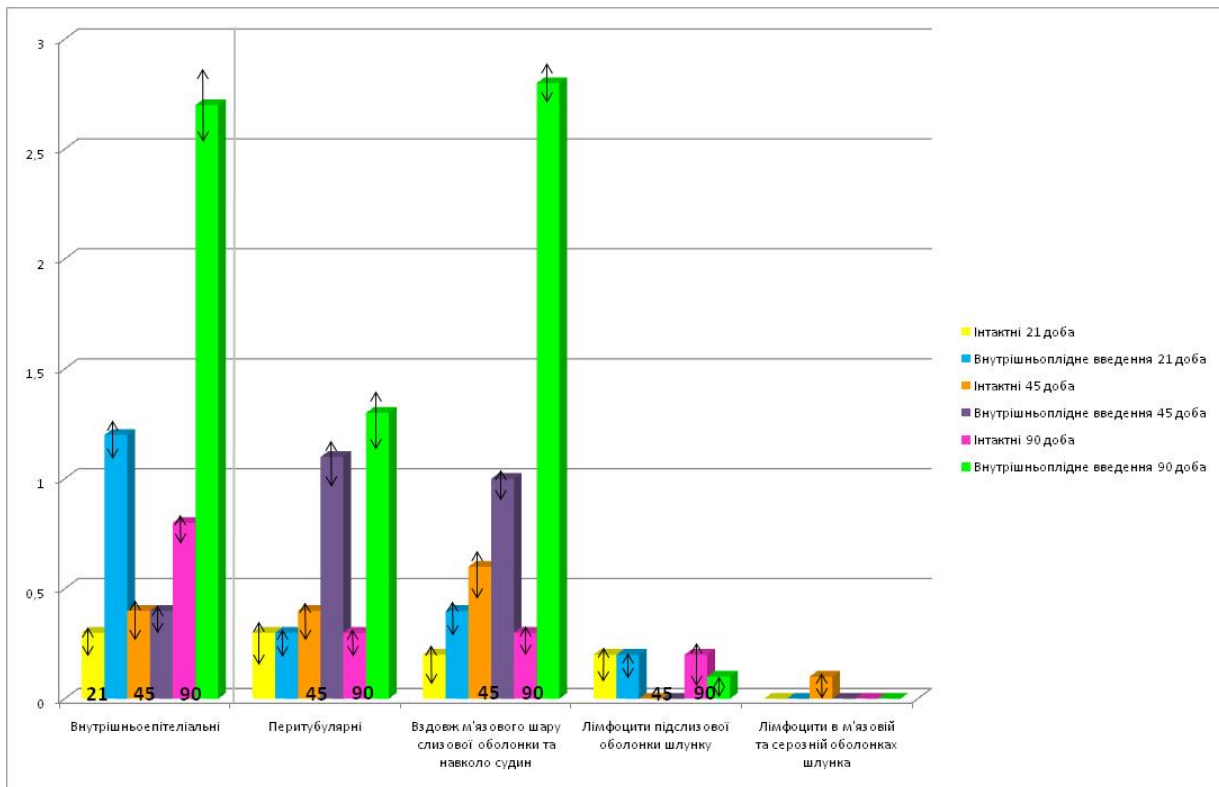


Рис. 3. Изменения содержания CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов в различных структурах дна желудка крыс в динамике эксперимента (x±S<sub>x</sub>).

На 90-е сутки постнатального периода развития в интактной группе содержание перитубулярных CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов увеличивается в 1,7 раза, по сравнению с животными той же группы на 45-е сутки жизни. В данной группе количество перитубулярных CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов преобладает над внутриэпителиальными в 1,6 раза. Внутриутробная антигенная стимуляция у животных 90-х суток жизни приводит к увеличению количества околожелезистых CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов

в 1,9 раза (рис.1). У интактных животных 90-х суток жизни количество околожелезистых CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов практически не меняется по сравнению с предшествующими возрастными периодами, но значительно возрастает на фоне внутриплодного введения противогриппозной вакцины (в 4,3 раза).

К отдельной группе относятся лимфоциты, расположенные вдоль мышечной пластинки слизистой оболочки желудка по обе ее стороны. Как



в собственной пластинке слизистой оболочки, так и в подслизистой основе эти клетки располагаются в виде одно- или двурядных цепочек, а также наблюдается их присутствие непосредственно около различных звеньев микроциркуляторного русла, чаще всего около венул. Данная группа клеток из всех исследуемых самая многочисленная. Именно в ней диффузно расположенные лимфоциты начинают приобретать вид т. н. периваскулярных скоплений (рис.4).

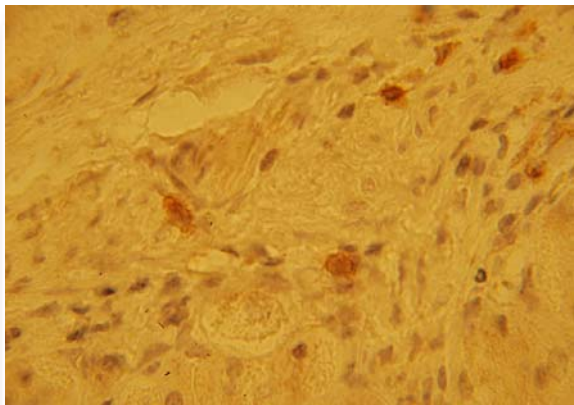


Рис. 4. CD3<sup>+</sup>-лимфоциты, расположенные периваскулярно в подслизистой оболочке желудка. 90 сутки жизни, экспериментальная группа. ×100.

В данной группе у интактных животных на 21-е сутки жизни среднее содержание Т – лимфоцитов составляет  $4,10 \pm 0,02$ , что незначительно больше количества перитубулярных лимфоцитов у животных того же возраста. У антигенпримированных животных 21-х суток жизни количество CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов увеличивается в 1,9 раза. Среднее содержание CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов на 21-е сутки жизни в интактной группе практически не меняется по сравнению с внутриэпителиальными и перитубулярными CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитами. В антигенпримированных животных сохраняется тенденция к увеличению количества CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов, расположенных вдоль мышечной пластинки слизистой оболочки желудка (рис.3). По сравнению с интактными животными их количество увеличивается в 2,0 раза.

На 45-е сутки жизни в интактной группе среднее содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, расположенных вдоль мышечной пластинки слизистой оболочки желудка, практически не превышает показатели внутриэпителиальных и перитубулярных лимфоцитов. Внутриутробная антигенная нагрузка незначительно увеличивает содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов (рис.1). Содержание CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов в интактных животных в данной группе больше, чем внутриэпителиальных и околожелезистых (рис.5). Их количество увеличивается также и в сравнении с интактной группой

21-х суток жизни в 3,0 раза. Внутриутробная антигенная нагрузка приводит к увеличению содержания CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов на 45-е сутки жизни в 1,7 раза.

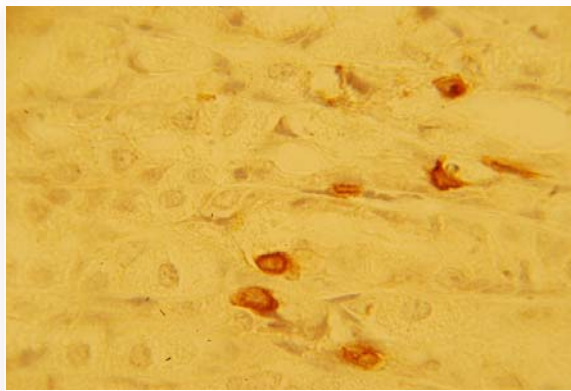


Рис. 5. CD79α<sup>+</sup> - лимфоциты, расположенные между собственными железами желудка. 45 сутки жизни, экспериментальная группа. ×100.

На 90-е сутки постнатального периода развития в интактных животных среднее содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, расположенных вдоль мышечной пластинки слизистой оболочки желудка, больше по сравнению с внутриэпителиальными и перитубулярными лимфоцитами. По сравнению с предыдущим возрастным периодом, их количество увеличивается в 1,9 раз. Внутриутробная антигенная стимуляция приводит к незначительному увеличению CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов в данной группе. В отношении CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов, расположенных вдоль мышечной пластинки слизистой оболочки и периваскулярно, их количество в интактной группе на 90-е сутки жизни не отличается от количества околожелезистых лимфоцитов. После внутриплодного введения вакцины их содержание увеличивается в 9,3 раза (рис.3). Значительно меньше лимфоцитов наблюдается в подслизистой основе и в толще мышечной оболочки желудка. В подслизистой основе лимфоциты располагаются преимущественно около сосудистой стенки. На 21-е сутки в интактной группе после внутриутробного введения антигена наблюдается увеличение количества CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, расположенных в подслизистой основе, в 3 раза, среднее содержание CD79α<sup>+</sup>-лимфоцитов остается на прежнем уровне.

На 45-е сутки жизни в экспериментальной группе наблюдается уменьшение содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов в подслизистой основе в 2,3 раза. В данном возрасте в подслизистой основе желудка CD79α<sup>+</sup>-лимфоциты практически отсутствуют, несмотря на повышенную антигенную нагрузку во внутриутробном периоде (рис.3).

Меньше всего CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов на 90-е сутки жизни наблюдается с локализацией в под-

слизистой основе (рис.1). Их количество увеличивается после введения антигена в 2,0 раза. Та же тенденция наблюдается в отношении CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-лимфоцитов. Но в этом случае после внутриплодного введения антигена их среднее содержание в подслизистой оболочке желудка не меняется.

В мышечной оболочке желудка встречаются единичные CD3<sup>+</sup>-лимфоциты. В период с 21-х по 90-е сутки жизни их количество увеличивается незначительно. Внутриутробная антигенная стимуляция у животных на 45-е сутки приводит к увеличению содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов в 2,0 раза, на 90-е сутки - в 3,0 раза. CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-лимфоциты в мышечной оболочке желудка отсутствуют (рис.3).

Таким образом в желудке крыс содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов значительно превышает содержание CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>-лимфоцитов. Наибольшее количество Т- и В-лимфоцитов наблюдается над и под мышечной пластинкой слизистой оболочки желудка в виде одно- и двухрядных цепочек и около сосудов (венул), расположенных преимущественно над мышечной пластинкой. Периваскулярно формируются скопления лимфоцитов, которые, по всей видимости, в последующих возрастных периодах дают начало развитию пе-

риваскулярных лимфоидных узелков. В ответ на внутриутробное введение антигена наблюдается увеличение содержания как Т – так и В – лимфоцитов. Более интенсивным и выраженным является иммунный ответ со стороны В – клеточного звена иммунитета. Высокая информативность иммуногистохимического метода позволила исследовать распределение популяционного состава лимфоцитов желудка в норме и его изменения на фоне внутриутробного введения антигена.

#### **Выводы**

1. В ответ на внутриутробное введение антигена отмечается увеличение содержания CD3<sup>+</sup> и CD79 $\alpha$ <sup>+</sup> лимфоцитов в стенке желудка крыс во всех исследуемых возрастных группах.

2. Более быстрыми темпами прироста количества отличаются CD79 $\alpha$ <sup>+</sup> лимфоциты, что свидетельствует о более активной антигенной стимуляции гуморального звена иммунитета.

#### **Перспективы дальнейших исследований**

В дальнейшем планируется изучение лимфоцито-эпителиальных взаимоотношений в слизистой оболочке желудка, иммуногистохимическое исследование макрофагов, плазмочитов в стенке желудка крысы после внутриутробной антигенной стимуляции.

#### **Литературные источники**

#### **References**

1. Karzov MV, Scherbakov MS, Medvedev AYe, Popravko MI. [Features of organ morphogenesis depending on the pathways of antigens into the fetus]. In: [Topical issues of medicine and biology: collection of articles]. Dnipropetrovsk; 1996. p. 135. Russian.

2. Voloshin MA, Kusch OG. [Lymphoid and vascular components as factors of morphogenesis]. Halytskyi likarskyi visnyk. 2003;10(2):45-8. Ukrainian.

3. Yevtushenko VM, Syrtsov VK. [Reactive features of lymphoid population in prostatic connective tissue after antigen exposure]. Zaporozhskiy meditsynskiy zhurnal. 2004;(4):114-5. Russian.

4. Guseinova ST, Guseinov TS. [Immunological aspects of gastrointestinal tract]. Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya. 2008;(5):76-8. Russian.

5. Denisov NL, Ivashkin VT, Lobzin YuV, Golofeyevskiy VYu. [Chronic gastritis from positions of

interaction of immune, contagious and morphological factors]. Russian journal of gastroenterology, hepatology, coloproctology. 2008;18(6):22-27. Russian.

6. Bilash SM. [Characteristics of diffuse lymphoid tissue cellular composition in the gastric mucosa of pyloric department at the introduction of preparation 'Platex Placental' on the background of acute experimental gastritis]. Zagalna patologiya ta patologichna fiziologiya. 2012;(4):60-3. Ukrainian.

7. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry. 4th ed. Elsevier; 2006. Chapter 19, Immunohistology of the breast; p. 699-745.

8. Barantseva IB, Naikhin AN, Donina SA, Stepanova LA, Rekstin AR, Grigoryeva EP, Desheva YuA, Rudenko LG. [The humoral and local immune response to influenza vaccine in the elderly and young]. Voprosy Virusologii. 2003;48(2):32-6. Russian.

**Ключко С.С. Імуногістохімічний аналіз розподілу різних популяцій лімфоцитів в структурах шлунку щурів після внутрішньоутробного введення антигену.**

**Реферат.** Мета: дослідити динаміку кількісного та якісного розподілу лімфоцитів в шлунку після внутрішньоутробного введення антигену імуногістохімічним, морфометричним та статистичним методами. Після внутрішньоутробного введення антигену в шлунку щурів вміст CD3<sup>+</sup>-лімфоцитів значно перевищує вміст CD79α<sup>+</sup>-лімфоцитів. На тлі внутрішньоутробного введення антигену змінюється динаміка вмісту CD3<sup>+</sup> та CD79α<sup>+</sup>-лімфоцитів. Висновки. У відповідь на внутрішньоутробне введення антигену спостерігається збільшення вмісту CD3<sup>+</sup> и CD79α<sup>+</sup> – лімфоцитів. Більш вираженою є імунна відповідь з боку В-клітинної ланки імунітету.

**Ключові слова:** шлунок, імуногістохімія, CD3 антиген, CD79α антиген.