

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК 591.27

К.А. Надеин

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ CD-3 ЛИМФОЦИТОВ В СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ

Автором статьи проведено иммуногистохимическое исследование соединительной ткани крупного рогатого скота в норме и при хроническом воспалении. Выявлено повышение количества T-лимфоцитов, которые локализуются в соединительной ткани.

Ключевые слова: бурсит, иммуногистохимия, соединительная ткань, T-лимфоциты.

К.А. Надеин

IMMUNOLOGIC, HISTOLOGICAL AND CHEMICAL RESEARCH OF THE CD-3 LYMPHOCYTES IN CATTLE CONNECTIVE TISSUE IN CASE OF CHRONIC INFLAMMATION

Immunologic, histological and chemical research of cattle connective tissue in health and in case of chronic inflammation is conducted by the author of the article. Increase of T-lymphocyte number which are localized in the connective tissue is revealed.

Key words: bursitis, immunologic and histological chemistry, connective tissue, T-lymphocytes.

Иммуногистохимия – метод морфологической диагностики, в основе которого лежит визуализация и оценка с помощью микроскопа результатов реакции антиген-антитело в срезах биопсированной ткани. В качестве антигена выступают компоненты клеточных структур или межклеточного вещества ткани. Исследуемую ткань обычно обрабатывают антителами к антигену, который хотят в ней выявить. Затем обрабатывают антителами к диагностическим антителам. Эти антитела содержат либо краситель, либо фермент, которые затем могут быть легко выявлены.

Ценность иммуногистохимии заключается в том, что она базируется на строго специфических реакциях между диагностическими антителами и комплементарными им антигенами.

Способ окрашивания клеточных и тканевых компонентов с помощью специфических антител для микроскопического исследования был предложен в 1941 году. Антитела были мечены флюоресцирующей краской, что позволяло обнаружить комплекс тканевого антигена и диагностического антитела в гистологических срезах с помощью люминисцентного микроскопа. Следующий шаг в развитии иммуногистохимии был связан с разработкой антител, меченных не флюорохромами, а ферментами. Для обнаружения места связывания меченных ферментом антител применяют субстрат, в котором под воздействием ферментных меток образуются окрашенные продукты. Ферментные метки позволяют получить постоянные гистологические препараты, которые могут длительно храниться, и в которых результаты иммуногистохимической реакции точнее привязаны к структуре тканей [10, с. 47].

Принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики, использующих реакцию антиген-антитело, является структурная специфичность исследования. Это означает, что в реакции оценивается не только наличие сигнала (есть окрашивание или нет) и его сила (интенсивность окрашивания), но и пространственное распределение сигнала в гистологическом препарате (окрашивание мембран клеток, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов). По данным литературных источников, иммуногистохимические исследования в ветеринарии применяются для диагностики инфекционных болезней [7, с. 155; 9, с. 381].

Наиболее часто в медицинской и ветеринарной практике встречаются диффузные болезни соединительной ткани (ДБСТ, или старое название – коллагенозы). Эта группа заболеваний, характеризующаяся

системным поражением соединительной ткани, в том числе волокон, содержащих коллаген [1, с. 155]. У крупного рогатого скота преимущественно поражается голеностопный (тарсальный) сустав. Особенно часто данная патология наблюдается у животных с высокой молочной продуктивностью, что ведёт к значительно-му экономическому ущербу.

Преобладающим механизмом болезней СТ является дисрегуляция Т- и В-клеточных факторов иммунитета при наличии в крови избыточного содержания антигена, в том числе и аутоиммунного происхождения. Образующиеся комплексы антиген-антитело активируют свертывающую систему крови, откладываются на базальной мембране сосудов, кровоснабжающих органы и ткани (почки, синовиальные, серозные оболочки, мозг и т. п.); высвобождаемые при этом из фагоцитирующих клеток лизосомальные ферменты способствуют углублению поражения. Цитотоксическое действие оказывают фиксируемый иммунными комплексами компонент, а также сенсibilизированные малые лимфоциты. В организме животных и человека Т-лимфоциты (CD3-лимфоциты) отвечают за реакции клеточного иммунитета и осуществляют иммунологический надзор за антигенным гомеостазом в организме. Они образуются в костном мозге и дифференцируются в вилочковой железе, где разделяются на эффекторные (Т-лимфоциты-киллеры, Т-лимфоциты гиперчувствительности замедленного типа) и регуляторные (Т-лимфоциты-хелперы, Т-лимфоциты-супрессоры) клетки. CD3-лимфоциты взаимодействуют с 24 кД белком Т-клеточного рецепторного комплекса. Они определяются как очаговое скопление в соединительной ткани в структуре воспалительного инфильтрата [2, с. 355]. Для понимания патогенеза и разработки тактики лечения ДБСТ крупного рогатого скота целесообразно изучение и сравнительный анализ происходящих морфологических изменений в суставной сумке тарсального сустава.

Цель исследований. Изучение местной реакции Т-лимфоцитов в соединительной ткани синовиальной сумки клинически здоровых и хронически больных животных.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований служила соединительная ткань суставных сумок, полученная после убоя здоровых и больных бурситом коров.

Контрольной группой служили клинически здоровые животные в количестве 30 голов (I группа), во второй (II) группе были животные, больные хроническим асептическим бурситом тарсального сустава (30 голов); длительность заболевания составляла свыше 1,5 месяцев. Животные находились в равноценных условиях кормления и содержания, больные животные лечились по одинаковой методике.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили в лаборатории морфологических исследований Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины МЧС России (ВЦЭРМ МЧС России). Ткани синовиальной оболочки фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 8–10 мкм обрабатывали набором антител фирмы «DAKO» к CD3 [3, с. 61].

Протокол ИГХ исследований:

1. Прогревание парафиновых блоков в термостате при температуре 60°C в течение 30–60 мин.
2. Депарафинизация в ксилоле (3 мин x 2 раза), абсолютном спирте (3 мин x 2 раза), 96° этиловом спирте (3 мин x 2 раза).
3. Блокирование эндогенной пероксидазы в 3 % перекиси на воде.
4. Промывание в дистиллированной воде (3 мин).
5. Восстановление активности антигенов путём кипячения в цитратном буфере (pH 6,0) или в ЭДТА (pH 9,0) в водяной бане. Стёкла со срезами помещают в контейнер с буфером, прогревают до момента выравнивания температуры буфера и воды (95–99°C под контролем термометра) и выдерживают 30 мин, затем ещё 20 мин при комнатной температуре. Переносят в дистиллированную воду на 1–2 мин. Промывание в TBS (2 раза по 5 мин).
6. Инкубация с первичными антигенами (18 ч при температуре 6°C), разведёнными Antibody diluent (DAKO).
7. Инкубация с Envision mouse или Envision rabbit в зависимости от вида первичного антитела (30 мин при температуре 37°C. После этапов 8 и 9 – промывание в TBS (2 раза по 5 мин).
8. Реакция с DAB (3–5 мин под контролем микроскопа при комнатной температуре). Рабочий раствор DAB готовится путём добавления к 1 мл буфера 1 капли концентрированного хромогена согласно инструкции.
9. Смывание хромогена дистиллированной водой, промывание в дистиллированной воде в течение 3 мин.
10. Докрашивание ядер гематоксилином (2 мин). Подсинивание в проточной воде под контролем микроскопа.
11. Обезвоживание и заключение в бальзам с 96° спиртом (2 мин x 2 раза), карбол-ксилол (2 мин x 2 раза), ксилол (2 мин x 2 раза).
12. Заключение в бальзам.

Результаты исследований и их обсуждение. Полученные результаты представлены в таблице.

**Содержание CD-3 лимфоцитов в соединительной ткани клинически здоровых животных (n = 30)
и больных бурситом коров (n = 30)**

Показатель	Клинически здоровые животные (n = 30)	Больные бурситом коровы (n = 30)
CD-3 (%)	18,8±1,14	37,5±0,64*

* – p<0,001.

Как видно из табл., в соединительной ткани коров с хроническим воспалением выявлено достоверное увеличение содержания CD-3 лимфоцитов. При этом изменялась локализация клеток: в группе здоровых животных единичные CD3-позитивные клетки располагались преимущественно вокруг сосудов, в то время как у больных бурситом вся синовиальная оболочка была диффузно инфильтрирована CD3-позитивными лимфоцитами (рис. 1–2).

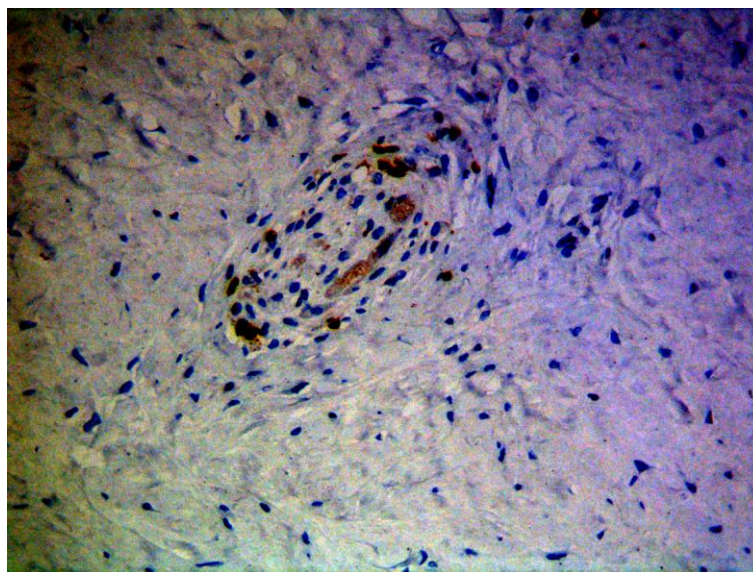


Рис. 1. CD3-позитивные Т-лимфоциты в синовиальной оболочке животных I группы. Увел. ×20

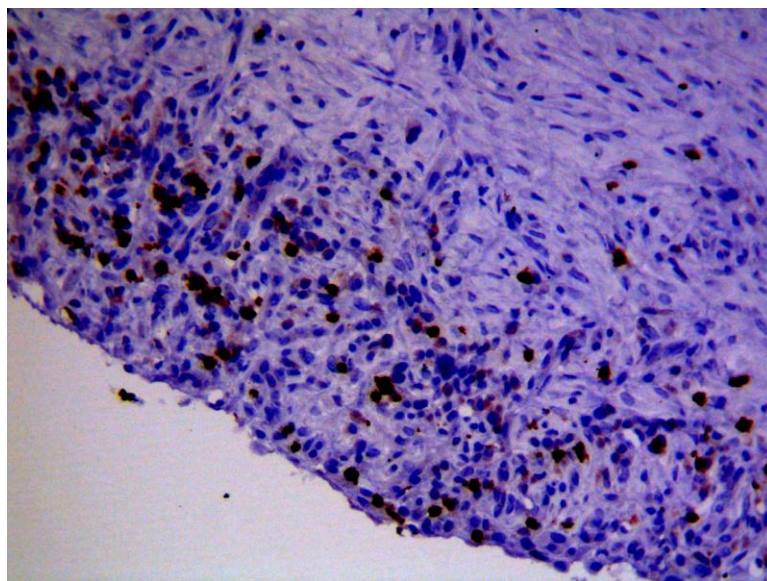


Рис. 2. CD3-позитивные Т-лимфоциты в синовиальной оболочке животных II группы. Увел. ×20

Повышение количества CD-3 лимфоцитов указывает на гиперактивность иммунитета и наличие иммунопролиферативных заболеваний в соединительной ткани.

Длительная активация Т-лимфоцитов может быть вызвана экзогенными антигенами и суперантигенами или изменёнными собственными белками (коллагеном, иммуноглобулинами) [5, с. 142]. Не исключено, что причиной воспаления служат перекрёстные реакции Т-лимфоцитов, сенсibilизированных к чужеродным антигенам различной природы с неизменёнными антигенами соединительной ткани синовиальной оболочки.

CD-3 обнаруживают отчётливую тенденцию к очаговому скоплению в воспалённой ткани. Ведущим фактором в подобной клеточной организации является массивный выброс хемокинов в очаге воспаления, в частности, бета-хемокинов, интенсивный диапедез клеток гематогенного происхождения, их активация и последующее распределение в очаге воспаления [4, с. 49; 6, с. 23].

Таким образом, хроническое воспаление соединительной ткани крупного рогатого скота характеризуется повышением количества Т-лимфоцитов в патологически изменённой ткани.

Литература

1. Изменение свойств клеток в очаге хронического воспаления / В.В. Виноградов, С.В. Мордвин, В.Д. Чимитов [и др.] // Физиология и патология соединительной ткани: тез. докл. – Новосибирск, 1980. – Т. 2. – С. 154–156.
2. Грицман Н.Н. Особенности реактивности соединительной ткани при некоторых коллагеновых заболеваниях // Соединительная ткань в норме и патологии. – Новосибирск: Наука, 1968. – С. 352–358.
3. Киясов А.П. Методы иммуногистохимии. – Казань, 1998. – 95 с.
4. Кондратенко И.В. Нарушение CD3- и CD2-зависимых путей активации Т-лимфоцитов при иммунодефицитных состояниях у детей // Иммунология. – 1998. – № 1. – С. 48–50.
5. Лозовой В.П. Нарушение регуляторных функций иммуногенеза при диффузных заболеваниях соединительной ткани // Физиология и патология соединительной ткани: тез. докл. – Новосибирск, 1980. – Т. 2. – С. 141–143.
6. Яздовский В.В. Динамика пролиферативного ответа лимфоцитов на митогенные лектины и анти-CD3-антитела в культурах цельной крови и выделенных клеток у здоровых людей // Иммунология. – 1994. – № 5. – С. 21–24.
7. Immunohistochemical study of lymphomas of abdominal cavity origin in two cows with bovine leukemia virus / Abe Yuka, Shoji Hiroshi, Ota Kazuhiro [et al.] // JARQ: Jap. Agr. Res. Quart. – 2007. – № 2. – С. 153–156.
8. Banerjee D., Pettit S. Endogenous avidin-binding activity in human lymphoid tissue // J. Clin. Pathol. – 1984. – Vol. 37. – P. 223–230.
9. Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases on ovine and bovine encephalitis / C.M. Campero [et al.] // J. Vet. Med. B. – 2002. – № 8. – С. 379–383.
10. Naish S.J. Handbook – Immunochemical staining methods. – Carpinteria: DAKO Corporation, 1989. – 120 p.

